



**Estudo do direccionamento ativo de nanossistemas lipídicos
com antagonista G para células de cancro de pulmão**

Ana Margarida Ferreira da Silva

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:
Doutora Maria Luísa Teixeira Azevedo Rodrigues Corvo (iMed.Ulisboa/FFUL)
Prof. Doutora Helena Susana Pappámikail da Costa Marinho (CQB/FCUL)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao corpo docente, direção e administração da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa que me proporcionaram as condições ideais para uma formação académica de excelência numa área que considero estimulante.

À Doutora Maria Luísa Corvo, por ter aceitado ser minha orientadora e me ter realmente orientado no laboratório, fazendo com que eu crescesse enquanto pessoa e discente. Agradeço a sua forma de ensinar, as críticas construtivas e principalmente a paciência para aturar as *mil e uma* perguntas. Aprendi imenso neste último ano e grande parte, devo-o a si.

À Doutora Helena Susana Marinho, por ter aceitado ser minha orientadora e, por me ter possibilitado, no primeiro ano do mestrado, começar a manusear a linha celular que viria a ser imprescindível este ano. Estou grata pelos conselhos, principalmente com as fotografias de microscopia e com a revisão dos textos. Agradeço a sua disponibilidade para resolver qualquer problema que surgisse.

À Doutora Manuela Colla que, apesar de não ser minha orientadora, se disponibilizou imediatamente para me ensinar tudo sobre os lipossomas com lípidos catiónicos e sobre o manuseamento de linhas celulares. Agradeço a cedência do antagonista G e de todos os reagentes necessários, quer para a ativação deste quer para a preparação dos lipossomas com lípidos catiónicos. Graças à sua paciência e conhecimento, foi possível alcançar um processo de desagregação alternativo, tornando a análise por citometria de fluxo possível. Agradeço-lhe ter despendido grande parte do seu tempo comigo, as *boleias* e por ter tentado sempre esclarecer-me aquando das minhas dúvidas.

Realço que este trabalho só foi possível devido à generosidade da Doutora Manuela Colla e do Doutor João Nuno Moreira da Universidade de Coimbra, que cederam as células H69.

Ao Denys por me ensinar os princípios da manutenção das células H69, quando eu não tinha qualquer experiência nesta área, e por ter um caderno de laboratório ótimo, que tornou o início do meu trabalho laboratorial muito mais simples.

À Doutora Carla Real e à Doutora Helena Soares pelos conselhos relativamente à manutenção da cultura celular e nos procedimentos de lavagem das células.

Ao Doutor Rodrigo Almeida por possibilitar a utilização do espectralfluorímetro e ao Doutor Fernando Antunes pelo empréstimo dos meios de cultura.

Ao Doutor Pedro Viana Baptista e à Doutora Alexandra Fernandes agradeço por terem permitido a utilização do citómetro de fluxo e à Catarina Rodrigues pela sua disponibilidade em ajudar sempre que foi preciso.

À Catarina Peneda e à Carolina Camelo pelos conselhos, pela partilha de conhecimento e pela paciência, sem vocês eu e as minhas células teríamos sofrido muito mais.

Ao Nago, o meu companheiro de tese, que tornou esta experiência muito mais alegre e que faz as melhores caipirinhas que já provei!

Às pessoas do Lumiar, que fizeram com que sentisse que o laboratório era uma segunda casa, principalmente à Mariana e à Nicole, por terem tornado o primeiro impacto muito mais fácil.

Ao DQB, por terem tornado os anos de licenciatura e mestrado em algo com muitas histórias boas para recordar.

Um muito obrigado aos meus amigos, que sempre me apoiaram bastante e que, neste último ano, fizeram com que, de vez em quando, parecesse que continuava a ter vida social, em especial à Filipa, pela partilha de “dramas” que só para nós fazem sentido.

À “minha” Rita e à “tia” Isabel, fica um obrigado por todos estes anos a aturarem-me e pela preocupação com a minha sanidade mental, mesmo quando acham que eu sou louca por ter células.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento gigante à minha mãe e àqueles a quem considero família, principalmente aos meus avós, Lourenço e Fernanda; aos meus “segundos” pais, Natália e Tiago; aos meus irmãos “emprestados”, Cristina e Paulo, e ao meu “puto” Santiago, por sempre acreditarem nas minhas capacidades e por sempre me apoiarem em tudo. Foi graças a vocês que tudo isto foi possível.

ÍNDICE

I.	Introdução.....	1
1.	Carcinoma de pequenas células do pulmão	2
2.	Sistemas de veiculação de fármacos	4
3.	Lipossomas	5
3.1.	Métodos de preparação.....	6
3.2.	Caraterização das formulações lipossomais	8
3.2.1.	Raio hidrodinâmico.....	9
3.2.2.	Potencial zeta.....	10
3.3.	Classificação	12
3.3.1.	Lipossomas convencionais	13
3.3.2.	Lipossomas de longo tempo de circulação	13
3.3.3.	Lipossomas catiónicos	14
3.3.4.	Lipossomas direcionados	15
3.3.4.1.	Direcionamento para o sistema fagocitário mononuclear.....	15
3.3.4.2.	Direcionamento passivo	16
3.3.4.3.	Direcionamento ativo	17
3.3.4.3.1.	Direcionamento com antagonista G	18
3.4.	Considerações finais	18
II.	Objetivos.....	22
III.	Materiais e Métodos.....	24
1.	Materiais	25
1.1.	Reagentes	25
1.2.	Células	25
2.	Métodos	25
2.1.	Preparação de formulações lipossomais	25
2.1.1.	Formulações lipossomais com lípidos neutros (NDLipNeut)	26
2.1.2.	Formulações lipossomais com lípidos catiónicos (NDLipCat).....	26
2.2.	Direcionamento de formulações lipossomais com antagonista G	27

2.2.1.	Ativação do antagonista G com um grupo sulfidrílo.....	27
2.2.2.	Ligação do antagonista G aos lipossomas pelo método direto (DirLipNeut)	27
2.2.3.	Ligação do antagonista G pelo método de pós-inserção.....	28
2.2.3.1.	Formulações com lípidos neutros direcionadas (PosInsLipNeut)	28
2.2.3.2.	Formulações com lípidos catiónicos direcionadas (PosInsLipCat).....	29
2.3.	Marcação das formulações lipossomais com rodamina B	29
2.4.	Caraterização das formulações lipossomais.....	30
2.4.1.	Determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas	30
2.4.2.	Determinação do potencial zeta	30
2.4.3.	Quantificação do teor lipídico	30
2.4.4.	Doseamento do antagonista G.....	30
2.4.5.	Quantificação da rodamina B por fluorescência	31
2.5.	Ensaio de internalização de lipossomas na linha celular H69	31
2.5.1.	Contraste de fase e microscopia de fluorescência em células não fixadas.....	32
2.5.2.	Contraste de fase e microscopia de fluorescência em células fixadas	32
2.5.3.	Citometria de fluxo em células não fixadas	33
IV.	Resultados e discussão	34
1.	Notas introdutórias	35
2.	Lipossomas de longo tempo de circulação não direcionados	35
2.1.	Lipossomas com lípidos neutros (NDLipNeut)	35
2.2.	Lipossomas com lípidos catiónicos (NDLipCat)	37
3.	Lipossomas de longo tempo de circulação direcionados.....	37
3.1.	Antagonista G	37
3.1.1.	Estudo do método de doseamento do antagonista G na presença de lipossomas	38
3.1.2.	Estudo da influência do diâmetro dos lipossomas na ligação ao antagonista G.....	40
3.1.3.	Estudo do tempo de incubação no método de pós-inserção.....	41
3.2.	Caracterização das formulações lipossomais com lípidos neutros direcionadas com antagonista G (DirLipNeut e PosInsLipNeut)	42

3.3. Formulação lipossomal com lípidos catiónicos direcionada com antagonista G (PosInsLipCat).....	44
4. Internalização de lipossomas de longo tempo de circulação na linha celular H69	46
4.1. Microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência em células não fixadas....	48
4.2. Microscopia de fluorescência em células fixadas	51
4.3. Citometria de fluxo em células não fixadas	54
V. Conclusões.....	63
VI. Perspetivas futuras	66
Bibliografia.....	69
Anexos/Appendices	74

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 – Esquema da bicamada elétrica de uma partícula carregada em suspensão numa solução aquosa e da variação do potencial eletrostático nessa bicamada (citado de ⁴⁴).	11
Figura I.2 – Esquema dos dois métodos de ligação do antagonista G ativado aos lipossomas: método direto e de pós-inserção. Imagens do lipossoma e micela retiradas de ⁸⁸	21
Figura III.1 – Esquema da reação do antagonista G com o 2-iminotiolano.	27
Figura III.2 – Esquema da reação entre o antagonista G ativado e o DSPE-PEG ₂₀₀₀ -maleimida.	28
Figura IV.1 – Esquema das reações que podem ocorrer quando o 2-iminotilano reage com uma molécula que contém uma amina primária, como o antagonista G, ao pH preferencial da reação. Adaptado de ⁹⁴	38
Figura IV.2 – Espetros de excitação (A) e emissão (B) de duas concentrações de antagonista G diferentes – 0,8 µg/mL (verde) e 2 µg/mL (azul) – e de uma amostra de lipossomas com lípidos neutros (laranja) (após a subtração do branco: NDLipNeut em tampão citrato a 10 mM em NaCl a 145 mM, pH 6,0) com comprimentos de onda de emissão a 330 nm e excitação a 288 nm, respetivamente. Intensidade de absorção e fluorescência em unidades arbitrárias (u.a.).	39
Figura IV.3 – Curva de calibração representativa para o doseamento do antagonista G ligado aos lipossomas, obtida por espectroscopia de fluorescência com comprimentos de onda de excitação a 288 nm e emissão a 330 nm e largura de bandas de 5 nm para ambos. Intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (u.a.)	40
Figura IV.4 – Imagens de contraste de fase (esquerda) e microscopia de fluorescência (direita) das células H69 não fixadas após 1 h e 3 h de incubação com 250 µM de lipossomas, com lípidos neutros ou catiónicos, não direcionados (RhodNDLipNeut e RhodNDLipCat) ou direcionados com antagonista G (RhodDirLipNeu, RhodPosInsLipNeut e RhodPosInsLipCat, consoante se tenha usado o método direto ou o de pós-inserção), marcados com rodamina B (vermelho). Barra branca – 10 µm. Para tirar as fotografias recorreu-se à objetiva de ampliação 60 x e às seguintes condições: para o contraste de fase utilizou-se uma abertura da lente de 2,8 e um tempo de exposição de 1/6 s, para a microscopia de fluorescência da rodamina B utilizou-se uma abertura de 3,2 e um tempo de exposição de 1/5 s.	50
Figura IV.5 – Imagens de microscopia de fluorescência dos controlos negativos: células H69 fixadas e coradas com DAPI (azul) após 3 h de incubação sem terem sido adicionados lipossomas ou lipossomas marcados com rodamina B (vermelho) incubados sem células. As imagens foram obtidas separadamente com filtros para o DAPI (esquerda) e para a rodamina B (meio), tendo sido posteriormente sobrepostas (direita) com recurso ao <i>software ImageJ Fiji</i> (NIH, EUS). Barra branca – 10 µm. Para tirar as fotografias recorreu-se novamente à objetiva de ampliação 60 x e as condições usadas para a microscopia de fluorescência da rodamina B foram iguais às das células não fixadas	

(abertura da lente de 3,2 e tempo de exposição de 1/5 s). Para a fluorescência do DAPI a abertura da lente foi 3,2 e o tempo de exposição 1/400 s.	51
Figura IV.6 – Imagens de microscopia de fluorescência das células H69 fixadas e coradas com DAPI (azul) após 1 h e 3 h de incubação com 250 µM de lipossomas com lípidos neutros ou catiónicos, não direcionados (RhodNDLipNeut, RhodNDLipCat) ou direcionados com antagonista G (RhodDirLipNeut, RhodPosInsLipNeut e RhodPosInsLipCat, consoante se tenha usado o método direto ou o de pós-inserção), marcados com rodamina B (vermelho). As imagens foram obtidas separadamente com filtros para o DAPI (esquerda) e para a rodamina B (meio), tendo sido posteriormente sobrepostas (direita) com recurso ao <i>software ImageJ Fiji (NIH, EUS)</i> . Barra branca – 10 µm. Para tirar as fotografias recorreu-se à objetiva de ampliação 60 x e as condições usadas para a microscopia de fluorescência da rodamina B foram iguais às das células não fixadas (abertura da lente de 3,2 e tempo de exposição de 1/5 s). Para a fluorescência do DAPI a abertura da lente foi 3,2 e o tempo de exposição 1/400 s.	54
Figura IV.7 – Esquema representativo da forma do pulso detetado pelo citómetro na FCS no caso de haver uma única célula a passar pelo feixe de luz incidente ou duas células ligadas. Citado de ¹⁰³	55
Figura IV.8 - Representação da população de células H69 total detetada pelo citómetro de fluxo. Obtido com o <i>software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems</i>	56
Figura IV.9 – Representação da população de células H69 total detetada pelo citómetro de fluxo com a definição da região de interesse, R1. Obtido com o <i>software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems</i>	56
Figura IV.10 – Representação da população de lipossomas detetada pelo citómetro de fluxo com a região R1 definida (A) e número de eventos detetados consoante a intensidade de fluorescência obtida como filtro BL2, na região R1 (B). Obtido com o <i>software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems</i>	57
Figura IV.11 – Intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 em células H69 sem lipossomas adicionados (<i>cells unstained</i> – preto em A; rosa em B) ou incubadas com 750 µM de lipossomas com lípidos neutros não direcionados (ND - laranja) ou direcionados preparados pelo método direto (DIR - verde). A fluorescência foi obtida nas populações celulares todas (A) ou só na população celular definida na região R1 (B). Obtido com o <i>software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems</i>	58
Figura IV.12 – Intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 em células H69 incubadas com 2000 µM (rosa), 1000 µM (laranja) ou 750 µM (verde) de lipossomas com lípidos neutros não direcionados (A) ou direcionados preparados pelo método direto (B) na região R1. Obtido com o <i>software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems</i>	59
Figura IV.13 – Intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 em células H69 incubadas com 2000 µM de lipossomas com lípidos neutros não direcionados (laranja) ou direcionados preparados	

pelo método direto (verde) ou de pós-inserção (rosa) na região R1. Obtido com o *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*. 60

Figura IV.14 – Mediana da intensidade de fluorescência em R1 das células H69 sozinhas ou incubadas com lipossomas marcados com rodamina B. Comparação do valor obtido para a mediana da intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 nas células H69 sozinhas (amarelo) ou incubadas com lipossomas com lípidos neutros não direcionados ou direcionados com antagonista G preparados pelo método de ligação direto ou de pós-inserção, a diversas concentrações lipídicas: 2000 µM (azul), 1000 µM (laranja), 750 µM (verde). As medianas foram calculadas em 10 000 eventos de uma só experiência de citometria de fluxo, pelo *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1 – Exemplos de classificação dos lipossomas com base no seu método de preparação, nos seus parâmetros estruturais ou na sua composição e aplicação. Baseado em ^{48,49}	12
Tabela IV.1 – Caraterização dos NDLIPNeut. Os valores da média \pm desvio padrão para o diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e concentração lipídica dos lipossomas com lípidos neutros sem direcionamento com longo tempo de circulação foram obtidos para 3 experiências independentes (n=3).	36
Tabela IV.2 – Caraterização das formulações de NDLipNeut ao longo da extrusão. Os valores para o diâmetro hidrodinâmico (D_H) e índice de polidispersão (PDI) dos NDLipNeut foram obtidos para uma experiência representativa.	36
Tabela IV.3 – Caraterização das formulações de NDLipCat. Os valores da média \pm desvio padrão para o diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e concentração lipídica dos NDLipCat foram obtidos para duas experiências independentes (n=2).	37
Tabela IV.4 – Efeito do diâmetro dos lipossomas com lípidos neutros no rendimento da ligação de antagonista G. Os valores correspondem a uma experiência representativa para o diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (D_H) e percentagem molar de antagonista G em relação ao lípido total dos lipossomas extrusados por um filtro de 100 nm e 50 nm de diâmetro de poro.	41
Tabela IV.5 – Efeito do tempo de incubação na incorporação dos lípidos micelares contendo antagonista G em PosInsLipNeut. Os valores foram obtidos numa experiência representativa para a percentagem molar de antagonista G em relação ao lípido total dos lipossomas após uma incubação dos lipossomas com as micelas de 1 h e 18 h.	41
Tabela IV.6 – Caraterização global das formulações com lípidos neutros não direcionadas e direcionadas preparadas pelo método de ligação direto ou de pós-inserção. Os valores indicados são as médias \pm desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos 3 experiências independentes (n \geq 3)...	42
Tabela IV.7 – Estabilidade dos lipossomas com lípidos neutros. Comparação dos valores obtidos para o diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) de lipossomas com lípidos neutros sem e com direcionamento preparados pelo método direto e de pós-inserção imediatamente após serem preparados e após 2 anos da sua preparação.	44
Tabela IV.8 - Caraterização global das formulações com lípidos catiónicos direcionadas preparadas pelo método de pós-inserção de ligação do antagonista G aos lipossomas. Os valores indicados são as médias \pm desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos 3 experiências independentes (n \geq 3)...	45
Tabela IV.9 – Intensidade de fluorescência da rodamina B obtida para lipossomas, com lípidos neutros ou catiónicos, não direcionados e direcionados, marcados com Rhod. Os valores indicados são as médias \pm desvio padrão dos resultados obtidos em duas experiências independentes (n=2).	47

Tabela IV.10 - Caraterização global das formulações, com lípidos neutros ou catiónicos, não direcionadas e direcionadas preparadas pelo método de ligação direto ou de pós-inserção utilizados nas experiências *in vitro*. Os intervalos de valores indicados correspondem aos resultados obtidos em pelo menos duas experiências independentes ($n \geq 2$). 48

ABREVIATURAS

asODN – oligonucleótidos antissentido (*antisense oligonucleotides*);

Chol – colesterol;

DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindole;

DDS – sistema de veiculação de fármacos (*drug delivey system*);

DODAP – 1,2-dioleoil-3-dimetilamónio-propano;

DLS – espetroscopia de correlação fotónica (*Dynamic Light Scattering*);

DSPC – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina;

DSPE-PEG₂₀₀₀ – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-polietilenoglicol 2000;

DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-(N-polietilenoglicol 2000-maleimida);

EPC – fosfatidilcolina da lecitina de ovo;

EPR – permeabilidade e retenção aumentadas (*enhanced permeability and retention*);

FBS – soro fetal bovino (*bovine fetal serum*);

FCS – luz dispersa para a frente (*forward scattered light*);

FDA – *U.S. Food and Drug Administration*;

LDV – velocimetria de *laser* baseada no efeito de *Doppler* (*laser Doppler velocimetry*);

M3 – medição em modo misto (*Mixed Mode Measurement*);

microDDS – sistema de veiculação de fármacos com tamanho compreendido entre 1 e 1000 µm;

MLVs – vesículas multilamelares (*multilamellar vesicles*);

MPS – sistema fagocitário mononuclear (*mononuclear phagocytic system*);

nanoDDS – sistema de veiculação de fármacos com tamanho compreendido entre 1 e 1000 nm;

PALS – *Phase Analysis Light Scattering*;

PDI – índice de polidispersão (*polidispersion index*);

PEG₂₀₀₀ – polietilenoglicol de 2000 Da de massa molecular;

Rhod – N-(lissamina rodamina B sulfonil)-fosfatidiletanolamina da lecitina de ovo;

SCLC –carcinoma de pequenas células do pulmão (*small cell lung carcinoma*);

siRNA – *small interfering RNA*;

VETs – vesículas obtidas através de técnicas de extrusão (*vesicles obtained through extrusion techniques*).

RESUMO

O carcinoma de pequenas células do pulmão é um tipo particularmente agressivo de cancro do pulmão estando a ser desenvolvidas novas abordagens, como sistemas de veiculação de fármacos, de modo a criar terapias mais eficazes. Os lipossomas de longo tempo de circulação são um dos sistemas mais promissores, tendo tido algum sucesso em aplicações clínicas noutras patologias, visto que têm a capacidade de aumentar a eficácia dos compostos terapêuticos usados, podendo ser direcionados seletivamente para células alvo.

O objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade do hexapéptido antagonista G – o agente de direcionamento escolhido – em aumentar seletivamente a internalização de lipossomas de longo tempo de circulação na linha celular humana de carcinoma de pequenas células do pulmão (H69). Para isso, foram estudados dois métodos distintos para ligar covalentemente o péptido a este tipo de lipossomas previamente formados. Assim, após a ativação do péptido com um grupo sulfidrílico, procedeu-se à sua ligação covalente ao DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, um constituinte da bicamada lipídica dos lipossomas ou de micelas, consoante se estivesse a utilizar o método de ligação direto ou de pós-inserção. Obtiveram-se lipossomas com as mesmas características e com elevado rendimento de ligação, sendo que este último parâmetro foi superior no método direto.

Foi igualmente estudado o efeito da carga (neutra ou catiónica) da bicamada lipídica revestida com PEG₂₀₀₀ na conjugação de antagonista G aos lipossomas, tendo-se observado a não existência de diferenças nas suas características e que, em ambos os casos, a ligação do péptido tinha ocorrido de forma eficaz.

Estes dois tipos de formulações foram marcados com rodamina B para a realização de estudos *in vitro* na linha celular H69, tendo-se analisado a sua ligação aos recetores celulares e possível internalização de forma qualitativa, por microscopia de fluorescência, e quantitativa, através de citometria de fluxo. Por microscopia de fluorescência observou-se que o direcionamento dos lipossomas com antagonista G aumentava a sua associação celular nas células H69. No entanto, por citometria de fluxo os resultados não foram conclusivos, havendo necessidade de repetir estes ensaios quantitativos em diferentes condições.

Palavras-chave: lipossomas; antagonista G; direcionamento ativo de nanossistemas; método de pós-inserção; carcinoma de pequenas células do pulmão (SCLC).

ABSTRACT

Small cell lung carcinoma (SCLC) is a very aggressive subtype of lung cancer and, in an attempt to create more effective treatments, are being developed new approaches, such as drug delivery system. Some of them are already successfully applied in some pathologies' treatment and one of the most promising systems are liposomes sterically stabilized with poly(ethylene glycol)-lipid derivatives because of its ability to enhance the efficacy of the therapeutic compounds and their capacity to be targeted to specific cells.

The aim of this work was to study the ability of antagonist G, a peptide targeting agent, to selectivity improve the internalization of long circulating liposomes in the human SCLC cell line (H69). For that purpose, two different methods were studied in order to covalently attach antagonist G to previously prepared long circulation liposomes. Firstly, antagonist G was activated with a sulfhydryl group, which was then covalently linked to DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide from liposomes or micelles, depending on the method being used – direct or post-insertion method. Liposomes prepared by both methods displayed the same characteristics and a high coupling efficiency but liposomes prepared by the direct method were more efficient in antagonist G's coupling. The effect of the lipid bilayer's charge (neutral or cationic) coated with PEG₂₀₀₀ in the coupling of antagonist G to liposomes was also studied. No charge-dependent changes in liposome characteristics were found and both formulations can efficiently link antagonist G to liposomes.

The *in vitro* internalization in the H69 cell line was followed qualitatively by fluorescence microscopy, using targeted and non-targeted liposomes of both types labeled with rhodamine B. Results showed that the targeting of liposomes with antagonist G increased its cellular association. An attempt at quantifying liposome internalization in H69 was made using flow cytometry, but results weren't conclusive and so the quantitative analysis should be repeated under different conditions.

Keywords: liposomes; antagonist G; active targeting of nanosystems; post-insertion method; small cell lung carcinoma (SCLC).

I. Introdução

Apesar dos avanços contínuos que existem no sentido de prolongar e melhorar a esperança média de vida das pessoas, ainda há bastantes patologias para as quais as terapias utilizadas não têm melhorado significativamente, como é o caso do carcinoma de pequenas células do pulmão, que possui um elevado índice de mortalidade. De forma a aumentar a eficácia terapêutica para estas patologias têm sido exploradas diversas abordagens, uma das quais consiste na utilização de sistemas de veiculação de fármacos, sendo os lipossomas um dos mais promissores devido à sua elevada versatilidade.

O presente estudo focou-se no aumento da especificidade de um sistema lipossomal de veiculação de fármacos com recurso ao direcionamento ativo conferido pelo hexapéptido antagonista G para uma linha celular humana de carcinoma de pequenas células do pulmão (H69).

1. Carcinoma de pequenas células do pulmão

O cancro do pulmão é a principal causa de morte oncológica nos homens a nível mundial e nas mulheres nos países desenvolvidos, sendo a segunda maior causa de morte nas mulheres nos países menos desenvolvidos¹. Em 2012, este cancro representou 13 % do total de cancros diagnosticados¹, sendo que muitas das vezes já se encontra metastizado na altura do seu diagnóstico².

Devido a diferenças no comportamento biológico e na histologia existe uma subdivisão do cancro do pulmão: o carcinoma de pequenas células do pulmão (SCLC) que deriva de células neuroendócrinas² e representa cerca de 20 % dos cancros do pulmão³; e o carcinoma de não pequenas células do pulmão (NSCLC) que normalmente tem origem em células alveolares².

O SCLC possui uma elevada taxa de replicação e tem propensão a metastizar bastante cedo⁴, fazendo com que na altura do diagnóstico já 60 % a 70 % dos pacientes tenha metástases em órgãos distantes⁵. Este cancro é sensível à radioterapia e quimioterapia, tendo-se taxas de resposta de 60 % a 80 % no tratamento inicial³. Contudo como possui estratégias defensivas (aumento da expressão de genes antiapoptóticos e de resistência a fármacos e aumento das vias de defesa imunitária) que lhe permitem resistir aos tratamentos oncológicos usuais², a grande maioria dos pacientes sofre recaídas após alguns meses⁶.

O tempo médio de vida dos pacientes depende do estadió da doença: se o SCLC for limitado, ou seja, se o cancro estiver confinado a um hemitórax e aos nódulos linfáticos dessa região³ é de 18 meses, se o cancro for extenso é de 10 meses⁴. O estadió da doença afeta também o tipo de tratamento recomendado: no caso de o cancro ser limitado usa-se radioterapia e quimioterapia dupla – normalmente etoposido e um agente de platina –, podendo recorrer-se a cirurgia caso o cancro esteja num estado muito inicial; se o cancro for extenso utiliza-se quimioterapia dupla com um agente de platina e etoposido ou irinotecano, ou tripla com ciclofosfamida, doxorubicina e etoposido ou vincristina⁴. Nos casos em que o tumor reaparece o único agente aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) é o topotecano⁶, obtendo-se taxas de resposta de 20 % a 30 %⁴. A remoção cirúrgica raramente é utilizada, pois a doença não costuma estar suficientemente confinada para esse tratamento ser eficaz, identificando-se metástases no sistema nervoso central em 89 % a 90 % dos pacientes⁷. Tendo isso em conta, todos os pacientes que atingem uma remissão completa devem ser tratados com radioterapia craniana preventiva, devido à elevada frequência de metástases no cérebro e os sobreviventes a longo prazo devem ser monitorizados quanto ao aparecimento de um novo tumor⁷.

Apesar dos avanços nos regimes de quimioterapia e radioterapia e no melhor conhecimento da biologia do SCLC nos últimos 20 anos⁸, estes não são significativos ao ponto de se traduzirem num aumento considerável na taxa de sobrevivência⁶, mantendo-se o prognóstico a longo prazo do SCLC bastante pessimista: quando os

pacientes têm a doença limitada a taxa de sobrevivência após 5 anos é de 12 % a 17 %, mas quando é SCLC extenso a maioria dos pacientes morre nos 2 anos após o diagnóstico, diminuindo a taxa de sobrevivência ao fim de 5 anos para 2 %^{7,9}. No caso de não haver qualquer tratamento, o tempo médio de vida de pacientes com SCLC é de 2 a 4 meses, o que demonstra a agressividade desta doença³.

Esta falta de melhorias no tratamento de pacientes com SCLC pode dever-se à falta de métodos de detecção inicial do cancro uma vez que este, para além de apresentar um crescimento acelerado, também metastiza bastante cedo; e à quantidade limitada de tecidos tumorais para estudos, visto que a cirurgia não é o tratamento usual, pois já existem metástases aquando do diagnóstico⁶. Para além disso, como não há muita informação quanto aos mecanismos de resistência à quimioterapia deste tipo de cancro, não se sabe o que contribui para as diferentes respostas aos tratamentos habituais, impossibilitando a criação de um tratamento mais eficaz⁶. Por último, como o SCLC está ligado a uma exposição elevada e prolongada a carcinogénicos do fumo do tabaco que penetram nas células saudáveis e induzem mutações (ex. mutações Ras)² tornando-as cancerígenas, este cancro tem uma grande instabilidade genética – é o segundo cancro com maior carga mutacional associada⁶. Esta instabilidade que faz com que este tipo de cancro não seja caracterizado por um conjunto exclusivo de oncogenes alvo, não havendo então muitos alvos terapêuticos evidentes que permitam a criação de um tratamento eficaz⁶.

Todavia, sabe-se que no desenvolvimento de SCLC estão envolvidos *loops* autócrinos de crescimento, nos quais as células secretam péptidos que se ligam a recetores, ativando as suas próprias vias de crescimento⁷, tais como o fator de células estaminais, o fator de crescimento semelhante à insulina I, o péptido libertador de gastrina e a neuromedina B⁸; bem como a ativação de proto-oncogenes que, ao sofrerem mutações, originam oncogenes que afetam processos como a transcrição, aumentam a progressão tumoral e levam à perda de diferenciação terminal; perda ou inativação de genes supressores tumorais devido a mutações, deixando de haver controlo no crescimento e divisão celulares⁷.

De forma a tentar melhorar a eficácia dos tratamentos, para além de se continuar a investigar várias combinações de agentes citotóxicos⁴, estão a ser desenvolvidos novos fármacos que inibem a ação de fatores de crescimento fundamentais para a proliferação, resistência à quimioterapia e metastização do SCLC que atuam nas vias de sinalização dos recetores desses fatores de crescimento, como os recetores tirosina cinase, ou então nos mediadores de sinalização a jusante desses recetores⁸. Contudo, há que ter em consideração que pode ser necessário utilizar simultaneamente inibidores de recetores distintos, pois a proliferação das células pode não depender de um único recetor, e que os recetores têm que ser sensíveis aos inibidores utilizados⁸. Para a terapia anticancerígena ser mais eficaz pode ainda conjugar-se a utilização de inibidores a agentes citotóxicos.

Simultaneamente também se está a recorrer a novas terapias cujo objetivo é diminuir a toxicidade dos tratamentos, por exemplo ao recorrer-se a sistemas de veiculação dos fármacos e a aumentar a sua especificidade para os tumores¹⁰. Esse aumento de especificidade é conseguido ao direcionar o tratamento diretamente para moléculas cruciais no crescimento e progressão do SCLC ou então ao direcionar os compostos (fármacos, péptidos, material genético) para o tumor com o auxílio de anticorpos monoclonais ou pequenas moléculas que tiram partido da existência de antigénios ou recetores específicos das células tumorais, respetivamente¹⁰. Estas novas terapias, utilizadas ou não em combinação com as pré-existentes, permitirão ultrapassar parte dos obstáculos que impedem a eficácia dos tratamentos deste tipo de cancro, conseguindo-se assim melhorias na qualidade de vida dos pacientes e no prognóstico desta doença.

2. Sistemas de veiculação de fármacos

Durante o tratamento de uma patologia, o ideal é que o fármaco atinja o local onde vai exercer a sua ação numa concentração que esteja dentro da sua janela terapêutica (concentrações plasmáticas do fármaco que permitem obter o efeito terapêutico pretendido sem efeitos tóxicos) e que esta se mantenha constante durante um período de tempo suficientemente longo de modo a que o fármaco exerça a sua função¹¹. Porém, nem sempre isso é possível, devido a fatores como a degradação/metabolização antecipada do fármaco, a sua interação com outras moléculas/células e a dificuldade em ultrapassar barreiras biológicas, como as membranas celulares¹².

Na farmacoterapia convencional utilizam-se fármacos cuja absorção e disponibilidade dependem de fatores como a sua solubilidade, massa molecular e estabilidade química. Como normalmente esse tipo de fármacos possui baixa massa molecular, consegue atravessar vários compartimentos, atingindo diversos tipos de células, podendo então ser utilizados como estratégia terapêutica. Contudo, devido à sua baixa massa molecular, a sua eliminação renal é bastante rápida o que implica administrações frequentes e/ou doses elevadas de modo a que o efeito terapêutico desejado seja atingido¹¹. Outra desvantagem destes fármacos convencionais é a sua distribuição por todo o tipo de tecidos, o que frequentemente conduz ao aparecimento de efeitos secundários nocivos¹².

De forma a ultrapassar esses problemas, estão a ser desenvolvidas formulações que aumentam a disponibilidade dos fármacos, levando não só à minimização das doses administradas como dos efeitos secundários^{12,13}. Essas novas formulações consistem em sistemas de veiculação de fármacos (*drug delivery systems* – DDS) que têm como principal objetivo aumentar a atividade farmacológica dos fármacos ao melhorar tanto as suas propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) como farmacodinâmicas (mecanismo de ação e afinidade no local de ação)¹¹. Para além disso, estes sistemas facilitam a utilização de fármacos pouco solúveis^{14,15} e tornam o tipo de administração mais agradável para os pacientes, visto que podem não necessitar de ser administrados por via intravenosa e, mesmo no caso de se continuar a usar essa via, o número de administrações é inferior¹⁶.

Os DDS tanto podem ser sistemas lipídicos e/ou poliméricos como ser estruturas somente constituídas por carbonos ou elementos metálicos nos quais os fármacos estão incorporados, encapsulados ou ligados covalentemente, tais como lipossomas, capsomas, nano e microcápsulas, micelas, géis, dendrímeros, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro^{12,16}.

Com a utilização de DDS é então possível controlar-se a libertação do fármaco a nível do local e do momento em que ocorre¹⁶. O controlo do local onde ocorre a libertação do fármaco, que pode ser feito recorrendo a estratégias como o direcionamento ativo¹⁷, é útil quando a distribuição natural do fármaco causa efeitos secundários graves devido à interação com outros tecidos que não o alvo. Já o controlo temporal da libertação do fármaco é vantajoso em duas situações: quando o fármaco não consegue atingir o local de ação ou quando sofre alterações na sua estrutura que inviabilizam a sua função. Ao recorrer-se aos DDS, como o fármaco fica protegido de interações com outras moléculas, evita-se tanto a sua captura como possíveis alterações estruturais, garantindo-se que quando chega ao local de ação a sua ação farmacológica permanece intacta¹¹.

Ao usar DDS há que ter especial atenção ao mecanismo pelo qual ocorre a sua remoção do corpo: eliminação renal ou metabólica. Se for via renal, a passagem através da membrana glomerular só ocorre com substâncias cuja massa molecular é inferior a 50 kDa¹⁸, então no caso de os DDS serem constituídos por substâncias não biodegradáveis é muito importante saber este parâmetro, pois se estiverem acima desse limiar essas substâncias vão acumular-se no nosso organismo podendo aparecer problemas de toxicidade^{16,19}.

Um parâmetro bastante importante nos DDS é a sua dimensão, podendo-se fazer uma divisão entre micro e nanoDDS. Os nanoDDS podem ser vantajosos na medida em que têm a capacidade de atingir os capilares mais finos, conseguindo penetrar melhor nos tecidos/órgãos e ser acumulados no local alvo, para além de não haver o risco de obstrução das veias que existe em alguns casos com os microDDS – que, por esse motivo, por vezes não podem ser administrados pela via intravenosa¹¹. Usualmente também ocorre a sua acumulação no fígado e no baço, devido a possuírem uma vasculatura fenestrada, e nos pulmões, onde o fluxo sanguíneo é menor de modo a que ocorram as trocas gasosas no sangue que passa pelos capilares, aumentando a possibilidade dos nanoDDS saírem da circulação.

A carga superficial e hidrofobia/hidrofilia também são parâmetros relevantes nos DDS, pois influenciam a capacidade destes ultrapassarem as barreiras fisiológicas até o seu local alvo, garantindo-se assim a eficácia terapêutica do tratamento¹¹.

É ainda importante referir que a libertação do fármaco nos DDS pode ocorrer intra ou extracelularmente sendo este desenhado para o que for mais adequado para a terapia em causa: quando os nanoDDS atingem as células alvo podem ser endocitados através de recetores ou fagocitados, formando o endossoma/fagossoma cujo pH é mais ácido que o do meio extracelular (6,5 – 5,0 vs. 7,2 – 7,4, respetivamente). O endossoma vai ser absorvido pelo lisossoma (pH 4,0), formando-se um lisossoma secundário que possui enzimas hidrolíticas e digestivos que estão ativos em ambiente ácido. Desta forma, nos nanoDDS pode recorrer-se a ligações lábeis quer ao ambiente ácido como a enzimas específicos ou então usar nanoDDS cuja composição seja destabilizada pela alteração do pH, de modo a que o fármaco seja libertado intracelularmente^{12,20}. Em alternativa, como o pH dos tumores tende a ser inferior ao dos tecidos saudáveis, pode-se também tirar partido das ligações lábeis ao ambiente ácido ou da composição do DDS de modo a que o fármaco seja libertado no meio extracelular dos tecidos tumorais²⁰. Nesta última abordagem existem, no entanto, limitações, nomeadamente o facto de a variação do pH entre os tecidos tumorais e saudáveis ser em torno de 0,9, o que não é uma diferença muito elevada, e o facto de a zona mais ácida normalmente se encontrar no centro do tumor que pode ser pouco vascularizado dificultando o acesso dos DDS¹².

No presente estudo, vai ser utilizado um tipo específico de nanoDDS, nomeadamente os lipossomas, consistindo o próximo tópico numa abordagem mais profunda a este tipo de sistema de veiculação de fármacos.

3. Lipossomas

No início da década de 1960, Bangham²¹ descreveu pela primeira vez que lípidos de origem biológica, quando colocados numa solução aquosa, sofriam rearranjos espontâneos que levavam à formação de mesofases esmélicas, que consistem em estruturas concêntricas e fechadas de várias membranas bimoleculares separadas entre si por compartimentos aquosos e isoladas do núcleo interno aquoso e do meio aquoso onde estão suspensas – observações feitas com recurso a técnicas como difração de raios-X, microscopia eletrónica e de polarização.

Estas mesofases esmélicas constituíam um sistema membranar seletivamente permeável a iões, osmoticamente ativo^{21,22} e sensível a vários agentes farmacológicos e fisiológicos²³, servindo como um bom modelo membranar²¹ que permite estudar as propriedades – como a permeabilidade e o transporte – de várias membranas biológicas consoante a sua composição lipídica²³. Mais tarde este modelo foi levado por Weissmann para Nova Iorque passando as mesofases esmélicas a denominar-se lipossomas²².

Quando lípidos de origem biológica estão na presença de uma solução aquosa ocorrem rearranjos estruturais espontâneos²¹ que dependem de fatores como a razão entre os volumes de fase aquosa e lípido; o tipo de lípidos; a temperatura e a concentração em soluto da solução aquosa²⁴. O estado preferencial de diversos lípidos na presença de água ou soluções aquosas é o cristal líquido, cuja unidade estrutural consiste em membranas bimoleculares contínuas – que evitam que as cadeias hidrófobas estejam em contato com a solução aquosa – separadas por compartimentos aquosos, como é o caso dos lipossomas^{21,24}. Não obstante, existem outras estruturas que se podem formar, tal como as micelas, sendo as alterações estruturais reversíveis. A temperatura é tão importante como a concentração lipídica na determinação da estrutura dos lípidos na solução aquosa²⁵.

Os solutos e a água que ficam sequestrados entre as bicamadas lipídicas só conseguem difundir entre os compartimentos e o núcleo aquoso se atravessarem as membranas bimoleculares, caso contrário ficam isoladas em cada compartimento²¹. Esta capacidade de encapsular compostos que estruturas como os lipossomas possuem, foi investigada como técnica para entrega de enzimas²⁶ e fármacos²⁷, tendo-se revelado bastante útil nesses aspetos.

Com o decorrer das investigações, houve o aperfeiçoamento das técnicas de preparação dos lipossomas e da capacidade de controlar as suas características, permitindo que estes fossem utilizados em áreas tão díspares como as indústrias cosmética, alimentar e farmacêutica²⁸. Nesta última área, tem havido um interesse cada vez maior nos lipossomas enquanto sistemas de veiculação de compostos tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, sendo os primeiros encapsulados no interior hidrófilo dos lipossomas e os segundos incorporados na sua bicamada lipídica.

3.1. Métodos de preparação

Na preparação de lipossomas para uma aplicação clínica, as partículas têm que ser estáveis, ter um tamanho bem controlado e homogéneo, uma carga bem definida e com uma quantidade adequada de composto de interesse encapsulado ou incorporado. Apesar dos métodos de preparação inicialmente terem sido desenvolvidos para escalas pequenas, se o objetivo for a utilização dos sistemas lipossomais como alternativas terapêuticas, tem que haver a possibilidade de aumentar a sua escala de produção, e a sua otimização tem que ser de modo a garantir que o processo de preparação seja reproduzível, estéril (no caso de ser administrado diretamente no organismo), eficiente, rápido e rentável²⁹.

Devido à sua simplicidade, muitas vezes na preparação de lipossomas recorre-se ao método de hidratação do filme lipídico, onde lípidos dissolvidos num solvente orgânico são evaporados a pressões reduzidas num frasco de fundo redondo, formando-se um filme lipídico na parede deste que é posteriormente hidratado com uma solução aquosa acima da temperatura de transição do componente da mistura lipídica que possui a temperatura de transição mais elevada, formando-se vesículas multilamelares grandes²⁴. Ainda assim, este método tem algumas desvantagens como a baixa capacidade de encapsulação da solução aquosa e a necessidade da redução e homogeneização do tamanho (de vários μm para 50 – 200 nm de diâmetro) com recurso a técnicas de dimensionamento como a sonicação, a extrusão ou através da utilização de um homogeneizador de alta pressão (MicrofluidizerTM)²⁹. Caso se deseje aumentar a escala de produção deste método, seriam necessários equipamentos com uma grande área superficial para que o filme lipídico se formasse corretamente e só se poderia usar o homogeneizador para reduzir o tamanho – aparelho onde ocorrem colisões a elevada velocidade das partículas de modo a reduzir o seu tamanho – pois como esta pode ser feita com fluxo contínuo, é possível aplicá-la em elevados volumes de formulação³⁰. A utilização do homogeneizador de alta pressão permite obter populações lipossomais monodispersas e bastante

reprodutíveis, apesar de haver limitações no controlo do tamanho e haver perdas de volume. As outras técnicas de dimensionamento foram excluídas no caso de se querer aumentar a escala pois na sonicação, quer fosse realizada com sonda ou com banho de ultrassons, é difícil aplicar de forma uniforme os ultrassons a um elevado volume de formulação, aumentando o risco de oxidação e degradação dos lípidos, bem como do composto de interesse (ex. fármaco), e da contaminação da formulação com partículas de titânio da sonda³¹. Já na extrusão a baixa pressão, por filtros com diâmetro de poro definido, apesar de haver menos perdas de volume que no homogeneizador e das populações lipossomais serem bastante reprodutíveis e monodispersas, é difícil controlar a temperatura em volumes elevados e há a tendência dos lípidos se depositarem nas membranas, o que não só atrasa o fluxo como pode entupir os poros²⁹. A sonicação, mesmo que seja só para volumes pequenos de formulação, tem ainda como desvantagens originar populações de lipossomas bastante polidispersas e pouco reprodutíveis³¹ e de haver uma baixa capacidade de encapsulação dos lipossomas formados, visto que o volume encapsulado é bastante pequeno, o que limita o tamanho dos compostos que podem ser encapsulados. Para além disso, esta técnica pode gerar aerossóis, caso se esteja a utilizar a sonda de ultrassons, e há o risco da distribuição dos lípidos nas membranas interna e externa dos lipossomas ser assimétrica³², sendo preferível utilizar-se uma das outras técnicas no dimensionamento.

Pode-se também preparar lipossomas misturando a fase orgânica contendo os lípidos diretamente com a fase aquosa em certas condições, como ocorre no método da evaporação de fase reversa e na técnica de injeção de solvente. No primeiro método, forma-se uma emulsão com as duas fases (orgânica e aquosa) na presença de excesso de fase orgânica e, posteriormente, há a evaporação do solvente orgânico em pressões reduzidas, formando-se vesículas unilamelares grandes³³. No segundo, lípidos dissolvidos no solvente, como etanol, são rapidamente injetados num excesso de solução aquosa aquecida, formando-se vesículas unilamelares pequenas – não sendo preciso redução de tamanho – com baixa polidispersão que encapsulam a solução aquosa^{34,35}.

A evaporação de fase reversa tem como vantagens possuir uma elevada razão de espaço aquoso por lípido e conseguir encapsular uma elevada percentagem da fase aquosa inicial³², mas como se formam vesículas unilamelares e oligolamelares grandes, é preciso recorrer a técnicas de redução do tamanho. Há que ter em consideração que se a razão entre a área superficial e o volume de formulação for muito grande durante a evaporação a pressão reduzida, o solvente orgânico pode evaporar muito rapidamente, evaporando-se também parte da água existente, passando a ter-se MLVs no final³². Uma das vantagens deste método é a sua elevada capacidade de encapsulação da solução aquosa, que varia entre 65 % e 20 % consoante a força iónica desta aumenta³³. Essa encapsulação ocorre de forma eficiente tanto para macromoléculas grandes como para compostos de baixa massa molecular sendo, portanto, uma vantagem adicional. No entanto, existem desvantagens, como quando não há a remoção da totalidade do solvente orgânico da formulação – por exemplo, através de uma diálise logo após a preparação – o que causa a formação de peróxidos que podem levar à degradação, tanto dos lípidos, como do composto de interesse. Como o último é exposto a solventes orgânicos, pode ainda perder a sua função terapêutica devido à perda da sua integridade estrutural ou, em caso extremo, devido à sua destruição³².

A técnica de injeção de etanol tem como vantagens a sua simplicidade, visto que é constituída por poucos passos, e a possibilidade de controlar o tamanho e polidispersão das vesículas ao se ajustar parâmetros como a temperatura e a velocidade a que ocorre a injeção da mistura de lípidos em etanol, ou a proporção entre etanol e água e a agitação da solução aquosa^{31,35,36}. Para além disso, é possível aumentar a escala de produção com um fluxo contínuo da fase aquosa onde ocorre a injeção da mistura de lípidos em etanol³⁷. Caso se esteja a utilizar éter como solvente, como este é imiscível com a água, há a vantagem deste ser removido logo após a injeção desde que a solução aquosa se encontre acima do ponto de ebulição deste³². As principais desvantagens neste método devem-se ao facto de nem todos os lípidos e compostos de interesse serem solúveis nos solventes, o que pode originar uma heterogeneidade quer na composição como no tamanho dos

lipossomas formados; da eficiência de encapsulação da solução aquosa ser baixa por os lipossomas estarem numa suspensão relativamente diluída e ter que se utilizar quantidades relativamente elevadas do composto de interesse caso este seja hidrófilo, visto que há um excesso de solução aquosa neste método^{32,34,38,39}.

Quando o composto de interesse são oligonucleótidos ou proteínas mais sensíveis, pode haver a necessidade de um processo de preparação que não seja tão agressivo em termos físicos e químicos, ou seja, que não envolva dimensionamento nem solventes orgânicos. Nesses casos, pode optar-se por preparar lipossomas pelo método da remoção de detergente, no qual os lípidos são misturados com detergentes numa solução aquosa, formando-se micelas³⁹. Posteriormente, há a diluição ou remoção do detergente, por exemplo, por diálise⁴⁰, originando-se então vesículas unilamelares homogêneas capazes de encapsular proteínas e oligonucleótidos na sua forma nativa, bem como outros compostos de baixo peso molecular^{32,39}. Este é então um método com alguma potencialidade de aumento de escala adequado principalmente para estes compostos, não obstante apresenta grandes desvantagens como uma baixa eficiência de encapsulação, tanto no caso de se recorrer à diluição como à remoção do detergente. Para além disso, como tem bastantes passos e tem que se garantir a remoção total do detergente, em termos de aumento de escala de produção este processo é pouco rentável a nível de tempo e custos^{38,39}.

No caso do composto de interesse ser hidrófilo, após os lipossomas terem sido preparados podem ser liofilizados, o que faz com que as bicamadas lipídicas e os compostos a encapsular fiquem em contacto uns com os outros, possibilitando uma maior encapsulação dos compostos na reidratação, obtendo-se eficiências de encapsulação muito elevadas mesmo para macromoléculas³⁹.

Para além dos métodos previamente abordados, há outras formas de preparação de lipossomas, sendo que uma das mais recentes consiste no uso de gases densos em métodos como a injeção de fluídos supercríticos e descompressão, onde normalmente os lípidos são dissolvidos em dióxido de carbono pressurizado e num co-solvente orgânico (ex. etanol), seguindo-se uma despressurização rápida em simultâneo com a mistura dos lípidos precipitados na fase aquosa, formando-se então lipossomas^{38,41}. As vantagens deste método são a obtenção de populações de lipossomas monodispersas, substancialmente livres dos solventes usados; ser um processo estéril e poder ser aumentada a sua escala de produção, tendo contudo como principal desvantagem os custos associados devido aos equipamentos que são necessários^{29,38}.

No final da preparação dos lipossomas, é usual haver a sua purificação, por exemplo, por ultracentrifugação, e a sua caracterização.

3.2. Caracterização das formulações lipossomais

Na composição dos lipossomas, bem como na das membranas biológicas, o componente maioritário usualmente são glicerofosfolípidos, que são moléculas anfipáticas constituídas por duas cadeias acilo ligadas por ligações éster a uma molécula de glicerol, à qual também está ligado, por uma ligação fosfodiéster, um grupo muito polar ou carregado, como resíduos de colina ou serina⁴², sendo este grupo o responsável pelas propriedades físico-químicas dos vários fosfolípidos. Também é habitual incluir-se colesterol nas formulações lipossomais, visto que este tem a capacidade de regular a estabilidade a bicamada lipídica na presença de fluídos biológicos⁴³. No entanto, as formulações lipossomais podem possuir muito mais moléculas distintas na sua composição. Para além das múltiplas combinações de lípidos, os lipossomas têm também outras características que podem variar bastante, sendo então necessário caracterizar sempre os lipossomas, nomeadamente quanto ao seu método de preparação, à composição lipídica, ao tamanho e índice de polidispersão (permite saber a homogeneidade dos tamanhos da população de lipossomas), à carga superficial

(indicada pelo potencial zeta), à lamelaridade, à eficácia de incorporação ou de encapsulação, à capacidade de carga e à razão composto/lípido, caso se tenha incluído algum composto de interesse na formulação²⁸.

A caracterização de lipossomas pode ser ainda mais extensa, caso se pretenda estudar outros parâmetros biofísicos. Assim sendo, tendo em conta que os sistemas lipídicos podem ter aplicação clínica, é usual ver-se, por exemplo, estudos de estabilidade, quer seja em diferentes solventes como em fluidos biológicos, a diferentes temperaturas – temperatura de armazenamento ou fisiológica – quer estudos do perfil de libertação do composto, de forma a perceber como é que esta ocorre após os lipossomas terem sido administrados.

De seguida, encontram-se explicadas as técnicas mais usuais para a determinação do tamanho e da carga superficial dos lipossomas, bem como os seus fundamentos teóricos.

3.2.1. Raio hidrodinâmico

Nos aparelhos da *Malvern Instruments*[®], de modo a determinar o raio hidrodinâmico das partículas, primeiro é medido o movimento *Browniano* destas – movimento devido a colisões aleatórias com as moléculas do líquido que rodeia as partículas – usando a espectroscopia de correlação fotónica ou *Dynamic Light Scattering* (DLS) e depois, a partir da velocidade obtida para o seu movimento *Browniano*, determina-se o raio hidrodinâmico das partículas pela equação de *Stokes-Einstein* (Equação I.1: R_H raio hidrodinâmico; k_B constante de *Boltzmann*; T temperatura; η viscosidade do meio; D coeficiente de difusão translacional, que define a velocidade do movimento *Browniano*)⁴⁴.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Equação I.1

Na espectroscopia de correlação fotónica, uma suspensão de partículas é iluminada com um *laser* (fonte de luz monocromática) e, devido à dispersão da luz causada pelas partículas – que como são mais pequenas que o comprimento de onda da luz incidente originam a dispersão de *Rayleigh* –, é detetado um padrão de manchas num detetor que está num determinado ângulo relativamente à fonte de luz⁴⁵. Esse padrão consiste numa mistura de zonas claras e escuras, consoante o tipo de interferência que a luz dispersada pelas partículas tem ao chegar ao detetor, se for uma interferência construtiva origina áreas brilhantes, se for destrutiva origina áreas escuras.

Como as partículas estão constantemente em movimento devido ao seu movimento *Browniano*, as interferências de fase construtivas e destrutivas da luz dispersada fazem com que as áreas brilhantes e escuras alterem de intensidade, originando assim flutuações. Ora é a velocidade dessas flutuações de intensidade que é utilizada para calcular o raio hidrodinâmico das partículas, através de um correlador digital que mede a semelhança entre dois sinais ao longo de um certo período de tempo⁴⁴.

Como o movimento *Browniano* das partículas ocorre em direções aleatórias, a correlação da intensidade de sinal diminui ao longo do tempo, variando entre 1 (correlação perfeita – intensidade do sinal comparada com ela própria) e 0 (sem correlação – intensidade do sinal num dado momento e 1 s depois).

A taxa de decaimento da função da correlação está relacionada com o tamanho da partícula, uma vez que em partículas pequenas, como a flutuação de intensidade do padrão de manchas é rápida, o decaimento da correlação vai também ser rápido. Assim, depois de se ter calculado a função de correlação é possível determinar-se o raio hidrodinâmico da partícula.

No caso de uma população de partículas, a função que descreve as flutuações de intensidade detetadas corresponde à soma de várias funções de correlação de partículas individuais, tendo que ser tratada com algoritmos de modo a extrair dados sobre as partículas analisadas. O *software* utilizado (*Zetasizer Software*) recorre à análise de cumulantes para tratar a curva de correlação obtida, fazendo o ajuste do logaritmo da função de correlação (G1) a uma função polinomial em função do *delay* (τ – tempo passado após o início da medição da intensidade de sinal)⁴⁴ (Equação I.2).

$$\ln[G1] = a + b\tau + c\tau^2 + d\tau^3 + \dots$$

Equação I.2

Só os 3 primeiros termos (a, b, c) é que são utilizados na análise, sendo que o valor de b corresponde ao coeficiente de difusão, que é posteriormente convertido no raio hidrodinâmico médio pela equação de *Stokes-Einstein* (Equação I.1), e a razão $2c/b^2$ corresponde ao índice de polidispersão (PDI), que indica a largura da distribuição dos tamanhos obtidos⁴⁴.

3.2.2. Potencial zeta

Quando uma partícula com carga está em contacto com uma solução aquosa, a carga da interface faz com que haja um rearranjo local dos iões livres da solução, originando uma região fina carregada próxima da interface. O rearranjo das cargas nessa interface, bem como os contra-íões (íões com carga oposta à da partícula) no líquido, são usualmente denominados de bicamada elétrica⁴⁶.

Essa bicamada elétrica consiste em duas camadas distintas: a camada compacta ou camada de *Stern*, que é uma fina camada de contra-íões logo a seguir à superfície carregada onde os contra-íões estão imóveis devido à forte atração eletrostática e, em torno desta, uma camada difusa, na qual os contra-íões estão fracamente associados. Nessa camada difusa, há uma fronteira denominada *slipping plane*, na qual os iões que se encontram no seu interior se movem com a partícula carregada consoante esta se move, e os iões que estão fora dessa fronteira não acompanham esse movimento⁴⁶ (Figura I.1).

O potencial eletrostático que existe entre a superfície da partícula e o líquido varia de acordo com a distância da superfície, denominando-se potencial zeta (ζ) quando corresponde ao potencial que existe nessa fronteira.

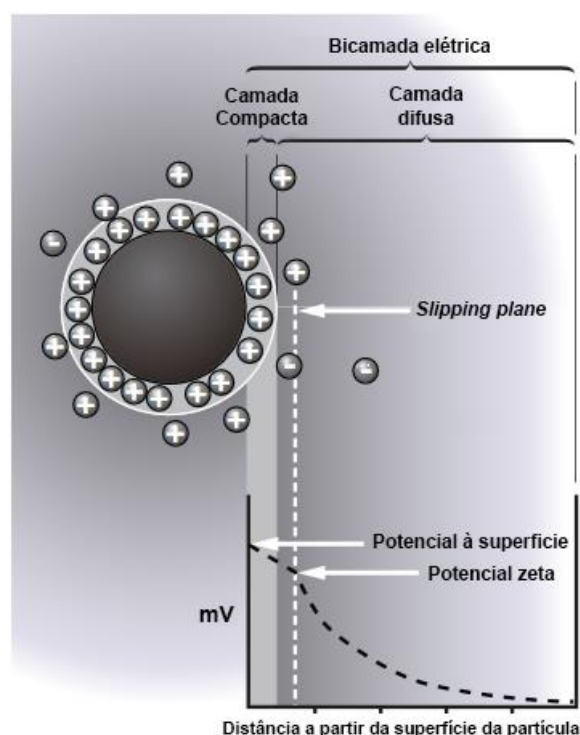


Figura I.1 – Esquema da bicamada elétrica de uma partícula carregada em suspensão numa solução aquosa e da variação do potencial eletrostático nessa bicamada (citado de ⁴⁴).

Existem diversas técnicas para medir o potencial zeta, sendo que uma delas se baseia na eletroforese. Nesta técnica o potencial zeta é determinado ao aplicar-se um campo elétrico num líquido de modo a induzir movimento nas partículas em direção ao eletrodo com carga oposta e medir a velocidade destas recorrendo à técnica *Laser Doppler Velocimetry* (LDV), obtendo-se então a mobilidade eletroforética das partículas⁴⁷. Como se sabe que essa mobilidade eletroforética (U_E) depende do potencial zeta (ζ), do campo elétrico aplicado, da viscosidade (η) e da constante dielétrica (ϵ) do meio, tendo-se conhecimento dos outros 3 parâmetros é possível saber-se o potencial zeta através da equação de *Henry* (Equação I.3: ka é a razão entre o raio da partícula e a espessura da bicamada elétrica; $f(ka)$ é a função de *Henry*):

$$U_E = \frac{2\epsilon \zeta f(ka)}{3\eta}$$

Equação I.3

A função de *Henry* usualmente tem um de dois valores: 1,5 quando se usa um meio aquoso com concentração de eletrólito moderada (aproximação de *Smoluchowski*), sendo esta a situação mais comum, ou 1 quando é um meio não aquoso ou quando se está a analisar partículas pequenas num meio com uma constante dielétrica baixa (aproximação de *Huckel*)⁴⁴.

Tal como já foi referido, para medir a velocidade de partículas na eletroforese recorre-se à técnica de *Laser Doppler Velocimetry* (LDV). Nesta técnica, a luz que é dispersa num ângulo de 17 ° é combinada com a luz do feixe de referência, originando variações de intensidade do sinal que é detetado. A taxa dessas variações é proporcional à rapidez das partículas, conseguindo-se então medir a velocidade destas. No entanto, como a aplicação de um campo elétrico origina outros fenómenos eletrocinéticos para além da eletroforese, como a

eletro-osmose, a velocidade que é medida tem interferências, não correspondendo à verdadeira mobilidade eletroforética das partículas. De forma a evitar estas interferências os aparelhos da *Malvern Instruments*[®] utilizam a técnica M3-PALS⁴⁴.

Esta técnica pode ser subdividida em duas partes, nomeadamente na técnica M3 (*Mixed Mode Measurement*) que consiste na medição da velocidade das partículas quando há reversão lenta e rápida do campo elétrico, e na técnica PALS (*Phase Analysis Light Scattering*) que é uma variação do LDV onde há a medição do desvio de fase da onda ao comparar a fase de luz dispersa pelas partículas com a fase de luz do feixe de referência, em vez de comparar diretamente as frequências, como ocorre no LDV.

Na técnica M3, para além de se medir a velocidade das partículas quando há a reversão lenta do campo elétrico, tal como ocorre no LDV, também se mede a velocidade quando há a reversão rápida do campo elétrico, onde o fenómeno de eletro-osmose ainda não começou, visto que as partículas carregadas respondem mais rapidamente à mudança do campo elétrico do que o solvente, devendo-se então a mobilidade das partículas observada só à eletroforese. Uma descrição mais detalhada desta técnica pode ser consultada em ⁴⁴.

No PALS, a fase da luz dispersa pelas partículas muda proporcionalmente à velocidade destas e, mesmo que haja interferência de outros efeitos eletrocinéticos, estes conseguem ser separados, aumentando bastante a sensibilidade da técnica para amostras com baixa mobilidade eletroforética, como ocorre por exemplo quando a viscosidade é elevada⁴⁴.

Em suma, o potencial zeta resulta da aplicação da equação de *Henry* à mobilidade eletroforética que é determinada pela soma dos desvios de fase de onda medidos durante as medições com reversão rápida do campo elétrico.

3.3. Classificação

Nesta área científica, a classificação dos diferentes tipos de lipossomas não é consensual, aparecendo descritas várias classificações, tendo por base o seu método de preparação, os seus parâmetros estruturais ou sua composição e aplicação, passando estes a ter designações distintas, tal como indicado na Tabela I.1.

Tabela I.1 – Exemplos de classificação dos lipossomas com base no seu método de preparação, nos seus parâmetros estruturais ou na sua composição e aplicação. Baseado em ^{48,49}.

Classificação de lipossomas
<u>Método de preparação:</u>
<ul style="list-style-type: none">• Congelamento-descongelamento (F/T)• Desidratação-reidratação (DRV)• Evaporação de fase reversa (REV)• Liofilização (LMLV)• Métodos de extrusão (VET)
<u>Parâmetros estruturais:</u>
<ul style="list-style-type: none">• Vesículas multilamelares (MLV)• Vesículas oligolamelares (OLV)• Vesículas unilamelares (ULV)• Vesículas unilamelares pequenas (SUV)

-
- Vesículas unilamelares grandes (LUV)
 - Vesículas unilamelares gigantes (GUV)
 - Vesículas multivesiculadas (MVV)

Composição e aplicação *in vivo*:

- Lipossomas convencionais
 - Lipossomas de longo tempo de circulação
 - Lipossomas catiónicos
 - Lipossomas direcionados
 - Lipossomas sensíveis ao pH
 - ...
-

A classificação dos lipossomas quanto à sua composição e aplicação *in vivo* é uma das mais úteis, pois permite perceber a intenção subjacente à criação dos lipossomas num dado estudo, sendo então explicadas seguidamente de forma mais detalhada algumas dessas classes.

3.3.1. Lipossomas convencionais

Os lipossomas convencionais consistem na 1ª geração de lipossomas criados e, normalmente, são compostos por fosfolípidos e colesterol. A sua principal característica, que foi a impulsionadora do aparecimento da 2ª geração de lipossomas, é um tempo de circulação curto, o que faz com que, após a administração destes lipossomas, estes sejam rapidamente removidos da circulação pelo sistema fagocitário mononuclear (MPS) devido a mecanismos como a opsonização por proteínas plasmáticas^{50,51}. Assim sendo, como a distribuição dos lipossomas é controlada pela interação com o MPS, estes localizam-se preferencialmente no fígado e no baço, havendo aí a sua acumulação devido à ação das células de *Kupffer* dos sinusoides do fígado e dos macrófagos do baço – ambos constituintes do MPS^{51,52}. É de salientar que, tanto a distribuição, como a eliminação dos lipossomas convencionais, estão diretamente relacionadas com a concentração administrada destes, ou seja, se a dose tiver sido suficientemente elevada, pode haver a saturação do MPS, o que faz com que o seu perfil de distribuição deixe de ser tão limitado e diminui a sua eliminação da circulação^{51,53}.

Este tipo de sistemas lipossomais normalmente é utilizado no tratamento sistémico de infeções cujas células alvo fazem parte do MPS¹², como é o caso da tuberculose, onde o alvo são os macrófagos alveolares⁵⁴.

3.3.2. Lipossomas de longo tempo de circulação

A segunda geração de lipossomas tem como principal característica um longo tempo de circulação, tal como é indicado pelo nome, podendo também ser denominados lipossomas estabilizados estericamente (*Stealth® liposomes*).

Este tipo de lipossomas é caracterizado pela presença na sua superfície de substâncias hidrófilas, tais como polissacáridos, glicolípidos ou polímeros hidrófilos – os polímeros são os mais utilizados atualmente, pois permitem uma circulação mais prolongada e não há tanta dificuldade na sua purificação –, que previnem a adsorção à superfície dos lipossomas de vários componentes em circulação, reduzindo assim a sua opsonização e consequente eliminação pelos macrófagos, prolongando o seu tempo de circulação^{50,55,56}. Desta forma estes sistemas lipídicos têm então um maior tempo de circulação na corrente sanguínea, visto que os polímeros têm a capacidade de mascarar a sua presença⁵⁰, tornando-os até certo ponto invisíveis para o MPS,

fazendo com que em vez de haver a sua acumulação preferencial no fígado e no baço desde que de tamanho adequado, estes consigam atingir outros locais, nomeadamente tumores sólidos e locais onde há inflamações que possuem uma maior permeabilidade vascular⁴⁸.

Para que os polímeros possam ser utilizados com esta função, têm de ser inertes, bem solvatados e compatíveis com o solvente usado no método de preparação da formulação lipossomal, sendo que um dos mais utilizados é o polietilenoglicol (PEG) que usualmente está ligado à 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DSPE) – uma das melhores âncoras lipídicas visto que sai da bicamada lipídica muito lentamente⁵⁷ –, de forma a estar incorporado nas bicamadas lipídicas^{55,56}.

Para que a estabilização das partículas seja eficaz há que ter em conta três fatores: a superfície das partículas deve estar toda revestida pelo polímero; a camada de estabilização deve ter uma espessura razoável e a ancoragem deve ser forte, por exemplo, o caso em que se recorre à incorporação nas bicamadas lipídicas do DSPE ligado ao PEG é preferível que a situação onde os polímeros só estão adsorvidos na superfície das partículas, visto que o revestimento se mantém durante mais tempo no primeiro caso⁵⁵.

Mesmo que todas estas características se observem, em algum ponto no tempo, todas as partículas de longo tempo de circulação acabam por ser eliminadas pelo MPS – o tempo de circulação destes lipossomas não costumam exceder 3 a 5 dias⁵⁸ – devido a alterações na camada de estabilização que favorecem a opsonização e a fagocitose como a clivagem das ligações entre o polímero e o composto que está inserido na bicamada lipídica e a rápida partição de algumas âncoras lipídicas, como as ceramidas, o que faz com que haja a remoção do lípido ligado ao polímero da bicamada para, por exemplo, lipoproteínas plasmáticas^{57,59}. É ainda de salientar que grande parte dos polímeros utilizados têm muitos grupos hidroxilo, que podem desencadear a ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento, havendo então a opsonização das partículas lipídicas e consequente eliminação destas⁵⁸.

Para além disso, esta classe de lipossomas habitualmente possui um tamanho reduzido (50 – 150 nm), o que evita a sua filtração pelo fígado, baço e pulmão e contribui para a redução da sua opsonização, visto que apresenta uma elevada curvatura^{55,58}.

Devido ao longo tempo de circulação característico destes lipossomas, estes podem também ser vistos como reservatórios dos compostos de interesse, pois, dependendo do seu método de preparação, podem conter uma elevada quantidade destes compostos, cuja libertação é modulada pelas propriedades físico-químicas dos lipossomas.

O aparecimento deste tipo de lipossomas fez reaparecer o interesse neste tipo de sistema lipídico, havendo desde então bastante investigação a ser desenvolvida para a sua aplicação com diversos fins, sendo um deles a sua utilização como sistemas de veiculação de fármacos⁵⁶.

3.3.3. Lipossomas catiónicos

Estes lipossomas são facilmente distinguíveis das outras classes pela presença de lípidos catiónicos na sua formulação, como o 1,2-dioleoil-3-dimetilamónio-propano (DODAP). O propósito da sua criação foi facilitar a entrega de DNA funcional às células, tirando partido da interação espontânea do DNA com os lípidos positivos⁶⁰, que forma complexos DNA-lípido – denominados lipoplexos⁶¹ – capazes de proteger o DNA e promover a sua internalização em células⁶⁰. Atualmente, estes sistemas catiónicos são utilizados para o transporte de vários tipos de material genético, como DNA, siRNA (*small interfering RNA*), asODN (oligonucleótidos antissentido) e plasmídeos, visto que como são todos negativos, o racional subjacente ao

desenvolvimento das formulações catiónicas mantém-se. Este tipo de compostos normalmente apresenta uma baixa eficiência de encapsulação em lipossomas, mas graças à interação entre as cargas opostas, com os lípidos catiónicos tem-se elevadas taxas de associação DNA/lípido⁶².

A maior vantagem da utilização deste sistema de veiculação para o transporte de material genético consiste na proteção deste da ação de nucleases plasmáticas, que normalmente causam uma degradação muito rápida destes compostos¹², tornando quase impossível utilizá-los sem recurso a um transportador apesar do seu elevado potencial terapêutico. Para além disso, como estes compostos têm muita dificuldade em atravessar barreiras biológicas¹², a utilização de lipossomas ajuda-os a ultrapassar as membranas plasmática e endossomal, de modo a que possam exercer a sua função¹⁶.

Apesar disso, a carga positiva desta classe de lipossomas aumenta a tendência de haver agregação dos lípidos durante a preparação dos lipossomas⁶² e de ocorrerem interações com proteínas plasmáticas²⁹. De forma a diminuir essas interações, e o consequente reconhecimento pelo MPS, é usual revestir-se estes lipossomas com PEG, utilizando uma âncora lipídica com uma partição mais rápida, tal como as ceramidas, de modo a que, após a chegada dos lipossomas ao local alvo, o revestimento com o PEG esteja destabilizado, permitindo que haja interações electrostáticas entre a carga positiva dos lipossomas e a carga negativa da membrana das células, sendo depois promovida a internalização destas partículas^{62,63,64}. Após a sua internalização, os lipossomas vão para o endossoma, onde tem de ocorrer a destabilização da membrana endossomal – que é favorecida pela carga positiva destas partículas – para que haja a libertação do material genético no citosol⁶¹. Ora, este é o passo que condiciona mais as terapias com material genético, uma vez que se não houver a sua libertação a partir do endossoma, ao continuar na via endocítica vai acabar no interior dos lipossomas onde há a sua destruição⁶¹. No caso de ser necessária a entrega do material genético no núcleo da célula para que este exerça a sua função, a eficácia da terapia é ainda mais condicionada, podendo recorrer-se a estratégias como a incorporação de péptidos sinalizadores da localização nuclear nos lipossomas que fazem com que a libertação do material genético ocorra no núcleo das células⁶⁵.

3.3.4. Lipossomas direcionados

Uma das características mais atrativas dos lipossomas, enquanto sistemas de veiculação, consiste na capacidade do seu direcionamento de modo a que o composto de interesse seja libertado no local alvo e numa concentração dentro da sua janela terapêutica, conseguindo-se assim atingir uma maior eficácia terapêutica. Para que isto ocorra, pode tirar-se partido de três tipos de direcionamento: o direcionamento para o MPS, o direcionamento passivo e ativo.

3.3.4.1. Direcionamento para o sistema fagocitário mononuclear

O sistema fagocitário mononuclear (MPS) é constituído por monócitos em circulação, células de *Kupffer* dos sinusoides hepáticos, macrófagos do baço, células mononucleares da medula óssea, células dendríticas da pele e outras populações de macrófagos existentes em vários tecidos⁵². Estas células têm uma elevada atividade endocítica e possuem recetores superficiais para vários componentes plasmáticos – denominados genericamente opsoninas como imunoglobulinas, componentes do sistema complemento, lipoproteínas, fatores de coagulação e fibronectina – que ficam adsorvidos em partículas, tal como os lipossomas, e promovem a internalização destes. Daí que a principal função do MPS consista em eliminar partículas estranhas da circulação^{50,51,56}.

Grande parte do reconhecimento das partículas pelo MPS é determinado por fatores físico-químicos destas, havendo uma eliminação mais rápida de partículas com superfície hidrófoba⁵⁰, maiores dimensões e carga superficial negativa⁶⁶. Assim, caso se pretenda direcionar os lipossomas para células fagocitárias, é exatamente esse tipo de características que a formulação deve possuir de modo a que quando entre em circulação haja a sua interação com as opsoninas, passando a ser vista como senescente pelo MPS e consequentemente fagocitada⁵¹.

Caso os lipossomas possuam carga positiva, consoante o tipo de lípido catiónico presente, pode também haver uma ativação considerável do sistema complemento⁶⁷ – lípidos catiónicos multivalentes como o dioctadecilamidoglicilpermina (DOGS) ativam mais que os monovalentes como o 1,2-dioleoil-3-trimetilamónio-propano (DOTAP)⁶⁸ – contudo, como estes lipossomas podem causar citotoxicidade⁶⁹ e induzir a produção de citocinas⁷⁰, desencadeando uma resposta imunitária sistémica que pode ser perigosa para o organismo, não são considerados uma boa estratégia para o direcionamento para o MPS.

Desta forma, contrariamente ao que usualmente se faz nos sistemas lipossomais, onde o objetivo é torná-los invisíveis para o MPS, no caso de patologias que afetam diretamente estas células fagocitárias, como doenças infecciosas como a tuberculose e a Leishmaniose ou em inflamações por exemplo no fígado, a formulação lipossomal deve ser rapidamente reconhecida pelo MPS – tendo-se o cuidado de não se desencadear uma resposta imunitária sistémica – recorrendo-se, por exemplo, a lipossomas convencionais negativos e com tamanho até 500 nm.

3.3.4.2. Direcionamento passivo

No caso de se pretender que o sistema de veiculação atinja os tecidos afetados por patologias, já tem que se voltar a utilizar a estratégia mais usual, evitando-se o reconhecimento dos lipossomas pelo MPS e a interação com os componentes plasmáticos, visto que esta pode destabilizar a membrana lipossomal havendo a troca de lípidos entre os lipossomas e alguns componentes, como lipoproteínas, alterando as características dos lipossomas e modificando o comportamento destes, ou havendo a libertação do composto de interesse sem ser no local suposto, deixando a terapia de ser eficaz^{51,56}. Para isso, pode-se adequar as características das formulações lipossomais de modo a haver a sua evasão ao MPS, nomeadamente utilizar lipossomas pequenos, neutros e revestidos por polímeros hidrófilos, tendo-se então um sistema que possui um elevado tempo de circulação⁵⁵.

Mesmo possuindo um tamanho reduzido, os lipossomas normalmente não conseguem passar através do endotélio capilar de tecidos saudáveis, excetuando o fígado e o baço onde o endotélio é fenestrado, contudo, no caso onde a integridade deste é afetada, como ocorre em tumores sólidos e processos inflamatórios, as partículas lipídicas conseguem extravasar através do endotélio^{11,51}. Nos tumores sólidos, devido à baixa drenagem linfática, que impossibilita a remoção correta das partículas do tecido, e à angiogénese muito acelerada, que origina uma vasculatura defeituosa, havendo por exemplo grandes aberturas no endotélio, ocorre a acumulação de partículas lipídicas no espaço intersticial do tumor^{20,71,72}. Já nos casos onde há um processo inflamatório, apesar de a drenagem linfática estar a funcionar corretamente, havendo a remoção das partículas do tecido, há um aumento da permeabilidade da vasculatura na zona inflamada de modo a possibilitar a extravasão das células fagocitárias, o que faz com que também consigam passar partículas lipídicas (< 150 nm de diâmetro) que estavam em circulação para essas zonas^{29,71}. Ora, esta acumulação dos lipossomas nos tecidos patológicos denomina-se direcionamento passivo e tira partido do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR – *enhanced permeability and retention*)¹¹ existente nesses tecidos. Como para que seja significativo o efeito EPR demora pelo menos 6 h⁷¹, os lipossomas mais utilizados neste tipo de direcionamento são os que têm um longo tempo de circulação, visto que quanto mais passagens ocorrerem nas zonas com uma vasculatura mais permeável, maior é a probabilidade de haver a sua

extravasão para os tecidos e consequente acumulação. Essa acumulação vai possibilitar uma melhoria na entrega do agente terapêutico no local desejado¹⁵ que tanto pode ocorrer no espaço extracelular como após internalização nas células²⁰, havendo uma melhor eficácia terapêutica.

Como as fenestras existentes nos tumores sólidos variam bastante de tamanho consoante o tipo de tumor, o tipo de vaso e a fase de angiogénese em que se encontram os vasos, deve optar-se por partículas de longo tempo de circulação pequenas¹⁶, de modo a que estas consigam sair da circulação e extravasar através dos vasos mais facilmente. Porém, há que ter em atenção que ao aumentar-se o tempo de circulação, uma parte significativa das partículas pode ficar retida em tecidos saudáveis¹³, principalmente nos órgãos responsáveis pela filtração do sangue (fígado e baço), podendo aparecer efeitos secundários.

3.3.4.3. Direcionamento ativo

Uma das maiores vantagens de utilizar sistemas lipossomais é a possibilidade do direcionamento para o local específico que estes possibilitam consoante o que se pretenda, tirando-se partido do chamado direcionamento ativo. Para que este ocorra normalmente utiliza-se lipossomas com longo tempo de circulação acoplados a ligandos que se ligam a epítomos ou recetores específicos ou sobre-expressos nas células alvo^{11,58}.

Este tipo de direcionamento surgiu como solução para a acumulação das partículas com longo tempo de circulação que ocorre em tecidos saudáveis no direcionamento passivo, conseguindo-se assim maximizar os sistemas de veiculação que chegam às células alvo e a consequente libertação do composto terapêutico no local desejado.

A utilização de sistemas com direcionamento ativo eficazes requer que se cumpram diversos parâmetros, nomeadamente a existência de marcadores específicos ou sobre-expressos nas células alvo e de um ligando, com bastante afinidade para esse marcador e que não seja facilmente reconhecido por células fagocitárias, passível de ser acoplado ao sistema de veiculação – preferencialmente através de uma ligação covalente – sem que isso afete o seu reconhecimento por parte do marcador. A partir do momento que ocorre a ligação ligando-marcador, esta tem de ser forte o suficiente para que a partícula já não saia desse local, de modo a que haja a libertação do composto terapêutico nas células alvo, quer esta ocorra por libertação do composto no local e posterior difusão através da membrana plasmática ou pela internalização do nanossistema pelas células e consequente libertação intracelular do composto⁷³.

Para além disso, para que possa ter uma aplicação clínica, estes sistemas com direcionamento ativo não podem ser facilmente reconhecidos pelo MPS, daí utilizarem-se normalmente lipossomas revestidos com PEG; as suas características têm que se manter estáveis ao longo de bastante tempo e deve haver a possibilidade de se aumentar a escala de produção²⁹.

Como estes sistemas são maioritariamente de longo tempo de circulação, uma alternativa bastante utilizada consiste na ligação dos ligandos à extremidade funcionalizada do PEG, nomeadamente anticorpos ou fragmentos destes e moléculas pequenas, tais como oligossacáridos que mimetizam ligandos para as selectinas, epítomos de anticorpos, fatores de crescimento, péptidos ou ligandos de recetores específicos (ex. ácido fólico, transferrina)^{17,58}.

É de referir que mesmo que o direcionamento tenha sucesso, isso não implica automaticamente que a terapia também o tenha, pois pode haver necessidade de existir internalização do nanossistema, que pode não ocorrer devido à heterogeneidade na capacidade de internalização das células. De forma a evitar isso, pode optar-se por estratégias onde após a ligação do ligando ao marcador, a transdução do sinal desencadeia efeitos específicos, como a apoptose da célula⁵⁸. Para além disso, tem também que se ter em atenção a possibilidade de haver a saturação dos recetores, pois caso isso ocorra perde-se a eficácia do direcionamento ativo¹⁶.

3.3.4.3.1. Direcionamento com antagonista G

No presente estudo utilizou-se um hexapéptido como agente de direcionamento, denominado antagonista G – H-Arg-DTrp-N^{me}-Phe-DTrp-Leu-Met-NH₂. O facto de se utilizar um péptido como agente de direcionamento tem como vantagens a sua biocompatibilidade e estabilidade, o facto de não ser facilmente reconhecido pelo MPS e a facilidade de ser ligado a nanopartículas mantendo a sua afinidade de reconhecimento pelo marcador celular, devido à possibilidade de se recorrer a espaçadores na sua ligação ao sistema de veiculação⁷⁴.

Sabe-se que as células de SCLC secretam diversos neuropéptidos – como a bombesina, a bradiquinina, a colecistoquinina, a galanina, a gastrina, a neurotensina e a vasopressina – que funcionam como fatores de crescimento e são reconhecidos por recetores sobre-expressos nas próprias células, originando assim *loops* autócrinos que regulam a proliferação tumoral⁷⁵. Tendo isso em conta, ao utilizar-se um antagonista que seja reconhecido por esses recetores, vai haver a inibição do crescimento dos tumores⁷⁶. Há estudos que mostram que o antagonista G – um derivado do neuropéptido substância P – tem exatamente essa capacidade, ou seja, inibe, de forma competitiva, a ligação entre neuropéptidos e os seus recetores celulares⁷⁷. Contudo, como existem muitos neuropéptidos a estimular o crescimento tumoral, uma estratégia baseada na inibição de um único recetor poderia não apresentar muito sucesso, mas como o antagonista G é um inibidor de largo espectro, tendo a capacidade de se ligar a uma vasta gama de recetores com estruturas distintas, consegue bloquear os efeitos biológicos de vários fatores de crescimento, sendo portanto uma estratégia mais eficiente para inibir o crescimento do SCLC quer *in vitro* como *in vivo*^{76,78,79,80}.

Houve ainda estudos que demonstraram que este péptido induz a apoptose de células de SCLC ao ativar cinases de proteínas de resposta ao *stress*, como a cinase do N-terminal da c-jun (JNK), e induzir a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS)^{77,81}.

Ora ao afetar simultaneamente a proliferação celular e a apoptose, o crescimento tumoral é bastante afetado⁷⁷, sendo exatamente isso que ocorre ao utilizar-se o antagonista G, pois por um lado este inibe o crescimento do tumor, ao funcionar como antagonista dos recetores de neuropéptidos, e, por outro, estimula a apoptose das células de SCLC.

Este reconhecimento do antagonista G por diversos recetores sobre-expressos em células de SCLC pode também ser vantajoso enquanto estratégia de direcionamento ativo, tendo já sido realizados estudos onde se utilizou este péptido como agente de direcionamento para sistemas de veiculação. Uns deles foram realizados por Moreira e colegas^{82,83,84} que observaram que este péptido promovia uma maior internalização dos lipossomas de longo tempo de circulação com antagonista G à superfície, com o consequente aumento de citotoxicidade do fármaco (doxorubicina) encapsulado nestes, tanto para a linha celular clássica, como variante, de SCLC – H69 e H82, respetivamente.

Pode-se então dizer que este péptido possui duas funções em simultâneo: agente de direcionamento e atividade antitumoral, o que é vantajoso para o tratamento do SCLC, pois assim, para além de haver o efeito do composto terapêutico transportado no sistema de veiculação, há ainda a ação antitumoral do péptido em si. Devido a esta dupla função, neste estudo o antagonista G foi utilizado como agente de direcionamento ativo de sistemas lipossomais criados de modo a poderem ser aplicados futuramente como alternativa terapêutica no tratamento de SCLC.

3.4. **Considerações finais**

Devido à grande variabilidade que os sistemas lipossomais apresentam, é possível tirar partido das características mais adequadas para a finalidade desejada, quer seja através da libertação de forma controlada dos compostos farmacológicos ou do seu direcionamento para o local alvo. Há ainda que ter em conta que

estes sistemas são biocompatíveis; têm a capacidade de reduzir a toxicidade do composto farmacológico ao diminuir a sua exposição a tecidos saudáveis; de alterar a disponibilidade do composto farmacológico, visto que o protegem da degradação pelo sistema imunitário e da interação com moléculas que podiam causar alterações na sua estrutura; de alterar as propriedades farmacocinéticas e a biodistribuição do composto visto que mascaram as propriedades físico-químicas deste que, muitas vezes, não são as mais adequadas¹⁷. É de notar que, durante o desenvolvimento de um novo sistema lipossomal para aplicação clínica, a cinética de libertação do fármaco está associada às propriedades dos lipossomas e às características da formulação usada, que podem já ter sido alvo de estudos anteriores, diminuindo a quantidade de estudos a ser realizados, ao contrário do que ocorre com sistemas onde a farmacocinética depende da ligação usada entre o composto de interesse e o sistema, havendo necessidade de muito mais estudos¹⁵. Assim, devido a todas estas vantagens pode dizer-se que os lipossomas são um dos melhores sistemas de veiculação de fármacos.

Tal como já foi referido, a ligação do agente de direcionamento ao sistema de veiculação é crucial para que o direcionamento ativo tenha sucesso enquanto estratégia terapêutica.

Esta pode ocorrer de várias formas, tendo sempre que ter como características uma elevada estabilidade, a manutenção da conformação específica do ligando de modo a que este seja reconhecido e não afetar, quer a integridade do ligando, de modo a que não seja afetada a sua afinidade para o marcador celular, como do sistema de veiculação para não alterar as suas propriedades⁷⁴.

Inicialmente, a ligação dos agentes de direcionamento era feita diretamente na bicamada lipídica, contudo foi observado que a utilização de moléculas espaçadoras levava a uma maior eficácia de internalização dos lipossomas⁸⁵. Para além disso, como muitas das vezes os lipossomas estão revestidos por PEG e este cria uma barreira que pode afetar a ligação ligando-grupo reativo no lípido, diminuindo bastante a sua eficiência, começou a fazer-se a ligação na extremidade do PEG, através de derivados funcionalizados do PEG, como o PEG-maleimida¹⁷.

Para além disso, foi visto que a densidade de ligandos à superfície do lipossoma necessária para garantir um direcionamento elevado das partículas também é importante⁷⁴ devendo haver a sua otimização, pois caso seja muito baixa pode não haver ligação ao recetor alvo, todavia se for demasiado elevada, pode haver interação não específica com células saudáveis e o sistema é mais facilmente reconhecido pelo MPS⁸⁶.

No presente estudo recorreu-se ao PEG-maleimida para formar uma ligação tioéster com elevada estabilidade entre o antagonista G (agente de direcionamento) e os lipossomas.

Existem 3 modos distintos de preparação de lipossomas com os agentes de direcionamento ligados covalentemente à extremidade do PEG: os ligandos podem ser misturados durante a preparação dos lipossomas, ligados após a formação destes ou inseridos em lipossomas pré-formados²⁹.

No primeiro método, a proporção adequada de lípido com PEG-ligando (que pode ter sido adquirido ou previamente sintetizado e purificado) é incluído durante a preparação dos lipossomas, utilizando-se o método de evaporação do filme lipídico e o dimensionamento de modo a obter-se vesículas com o tamanho desejado²⁹. A vantagem desta técnica consiste no conhecimento da quantidade de ligando presente nos lipossomas, uma vez que todos os lípidos adicionados são incorporados na bicamada lipídica. Porém, como existem no mínimo duas camadas lipídicas, estima-se que, no máximo, só cerca de metade dos ligandos é que vão ficar incorporados na camada exterior dos lipossomas, reduzindo assim bastante a quantidade de ligando acessível para ser reconhecido pelos recetores celulares, além de que, caso os compostos de interesse sejam encapsulados nos lipossomas, podem haver interações entre estes e os ligandos aparecendo efeitos indesejados⁷⁴. Caso o ligando seja uma proteína, pode haver o risco de esta desnaturar se, durante a preparação, tiver que se recorrer ao fornecimento de energia, por exemplo, sob a forma de calor, no dimensionamento dos lipossomas. Apesar dessas desvantagens, este é o método mais utilizado na preparação

de lipossomas com direcionamento ativo, visto que tem poucos passos, sendo fácil aumentar a sua escala de preparação²⁹.

No segundo método, o péptido é ligado à superfície funcionalizada de lipossomas pré-formados. Esta estratégia implica a introdução de grupos funcionais na superfície dos lipossomas capazes de se ligarem ao ligando, tal como a maleimida na extremidade do PEG⁸⁷. Este método tem como desvantagem o facto de os grupos funcionais serem lábeis, perdendo então a capacidade de ligarem o ligando com o passar do tempo, o que implica que este deve ser adicionado logo após a formulação lipossomal ter sido preparada. Para além disso, tal como ocorre no método anterior, cerca de metade dos grupos funcionais vai ficar voltado para o interior dos lipossomas, não podendo ser utilizado na ligação do agente de direcionamento e havendo a hipótese destes interagirem com os compostos terapêuticos encapsulados nos lipossomas aparecendo efeitos indesejados⁵⁸. Neste método, tem ainda que se garantir que a ligação do agente de direcionamento não interfere nem com a estrutura, nem com as propriedades dos lipossomas. Por fim, há ainda a desvantagem de a eficácia de ligação não ser 100 %, havendo a necessidade de remover os ligandos que não ligaram²⁹.

O terceiro método consiste no método da pós-inserção, no qual o PEG-maleimida está em micelas, havendo aí a ligação do agente de direcionamento e, posteriormente, ocorre a transferência dos conjugados PEG-ligando para a camada externa de lipossomas previamente formados. Esta estratégia permite que múltiplos ligandos sejam inseridos numa grande variedade de lipossomas, que podem já ter o composto terapêutico, possibilitando terapias adequadas ao perfil da patologia do paciente sem que tenha de haver vários processos de preparação distintos das partículas consoante o ligando e o composto terapêutico mais apropriados. Tem ainda a vantagem de se poderem otimizar as condições na preparação dos sistemas de veiculação, de modo a que haja uma maior encapsulação/incorporação do composto terapêutico, e na ligação do ligando, visto que são processos independentes¹⁷. A desvantagem deste método consiste na eficiência de inserção dos lípidos micelares nos lipossomas não ser 100 %²⁹, sendo afetada por fatores como a temperatura – os lipossomas têm que estar acima da temperatura de transição de fase de modo a que possa ocorrer a inserção dos lípidos micelares – e a concentração do lípido ligado ao ligando – para que se formem micelas, a concentração deste tem que ser superior à concentração micelar crítica, o que pode implicar mais custos no processo. Pode ainda haver alterações no perfil de libertação dos compostos de interesse, podendo haver perdas destes quando ocorre a inserção dos lípidos.

Neste estudo vão ser comparados o segundo e o terceiro métodos quanto à eficácia de ligação do antagonista G, denominados respetivamente método direto e de pós-inserção, tal como esquematizado na Figura I.2.

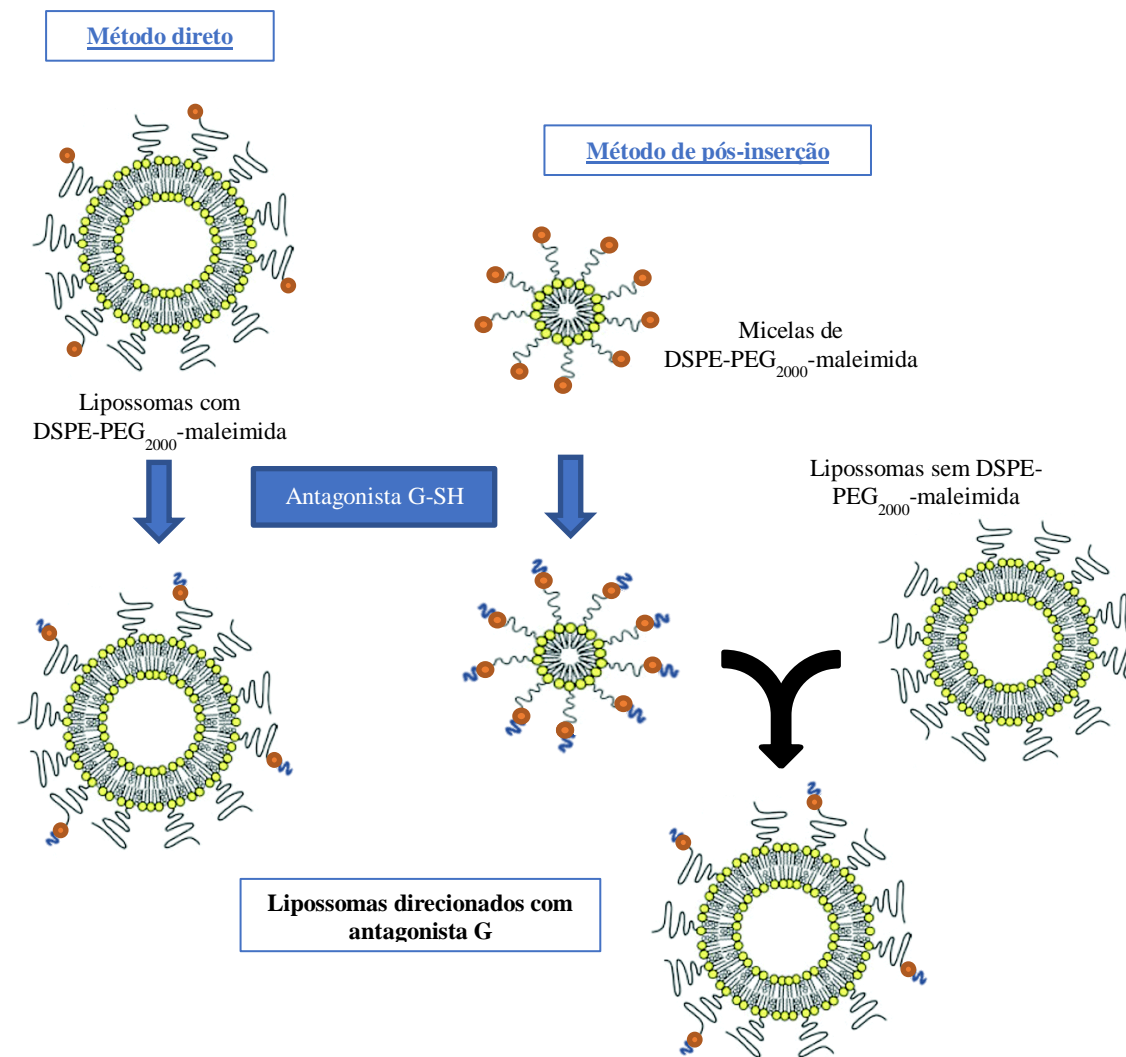


Figura I.2 – Esquema dos dois métodos de ligação do antagonista G ativado aos lipossomas: método direto e de pós-inserção. Imagens do lipossoma e micela retiradas de ⁸⁸.

II. Objetivos

O trabalho teve como objetivo principal a otimização de um sistema lipossomal de longo tempo de circulação para o eficiente direcionamento para a linha celular humana de carcinoma de pequenas células do pulmão (H69).

Teve também como objetivo averiguar o efeito da carga dos lípidos que constituem os lipossomas (neutros ou catiónicos) nas suas características e na internalização na linha celular H69.

O direcionamento dos lipossomas para estas células tumorais foi feito através do hexapéptido antagonista G (H-Arg-DTrp-N^{me}Phe-DTrp-Leu-Met-NH₂) por ligação covalente à superfície dos lipossomas, tendo este sido selecionado devido à sua capacidade de se ligar a vários recetores de neuropéptidos que se encontram sobre-expressos em células do cancro do pulmão, como é o caso das utilizadas neste estudo.

Adicionalmente, pretendeu-se estudar a eficácia de dois métodos de ligação distintos do antagonista G aos lipossomas, nomeadamente o método de ligação direta do antagonista G à extremidade funcionalizada do polietilenoglicol de lipossomas previamente formados e o método de pós-inserção, no qual o antagonista G está ligado à extremidade funcionalizada do polietilenoglicol em micelas e posteriormente ocorre a sua inserção em lipossomas previamente formados.

Devido ao direcionamento que os sistemas de veiculação de fármacos preparados possuem, é expectável que a sua ligação aos recetores e consequente internalização nas células tumorais de cancro do pulmão seja elevada comparativamente a sistemas sem direcionamento. Desta forma, pretendeu-se estudar a associação celular de lipossomas de longo tempo de circulação direcionados e não direcionados com antagonista G em células H69. Para esses estudos, recorreu-se à marcação dos lipossomas com rodamina B e analisaram-se os resultados de duas formas distintas: qualitativamente, onde se recorreu à técnica de microscopia de fluorescência e contraste de fase, e quantitativamente, através de citometria de fluxo com focalização acústica.

III. Materiais e Métodos

1. Materiais

1.1. Reagentes

Fosfatidilcolina de ovo (EPC) e fosfatidiletanolamina PEGilada com PEG de 2000 Da de massa molecular (DSPE-PEG₂₀₀₀) foram adquiridas à Lipoid GmbH (Alemanha). O colesterol (Chol) foi adquirido à Sigma Chemical Co. (*St. Louis, Mo*, EUA) e a fosfatidiletanolamina com PEG funcionalizado com maleimida (DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida) à NanoCS Inc. (EUA). A distearoil-fosfatidilcolina (DSPC), o dioleoil-dimetilamónio-propano (DODAP) e a fosfatidiletanolamina de ovo marcada com lissamina rodamina B (Rhod) foram adquiridos à Avanti Polar Lipids (*Alabama*, EUA).

O hexapéptido antagonista G foi sintetizado no *Alberta Peptide Institute* (*Edmonton, AB*, Canadá), com uma pureza de 95 % e o reagente para a sua tiolação, hidrocloreto de 2-iminotiolano (reagente de *Traut*) foi adquirido à Fluka (*Buchs*, Suíça).

O meio de cultura de células RPMI-1640, a penicilina-estreptomicina, a L-glutamina e soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos à Thermo Fisher Scientific, Inc. (*Utah*, EUA); o TrypLE™ Express foi adquirido à Gibco (*Grand Island, NY*, EUA); a poli-L-lisina e o azul de tripano foram adquiridos à Sigma (*St. Louis*, EUA). A sonda fluorescente específica para núcleos, 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) proveio do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Os restantes reagentes e solventes utilizados eram de grau analítico.

1.2. Células

A linha celular humana clássica do carcinoma de pequenas células do pulmão (H69, HTB-119) é da *American Type Culture Collection* e foi mantida em frascos de cultura de 25 cm² ou 75 cm², em meio RPMI-1640 suplementado com FBS a 10 % (v/v) inativado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e L-glutamina 2 mM.

As células foram mantidas na fase logarítmica de crescimento numa estufa a 37 °C sob atmosfera humidificada (90 % humidade) e com 5 % de CO₂.

2. Métodos

2.1. Preparação de formulações lipossomais

Foram preparadas duas formulações lipossomais distintas, uma com lípidos neutros e outra com catiónicos, cujos nomes vão ser abreviados como LipNeut e LipCat, respetivamente. Para ambas foram preparados lipossomas não direcionados e lipossomas direcionados com antagonista G, sendo que a única diferença foi a presença de DSPE-PEG-maleimida nos últimos, de modo a possibilitar a ligação do antagonista G ativado – método de acoplamento de ligandos ao terminal do PEG^{89,90}. O antagonista G foi ativado com um grupo sulfidrílo e ligado covalentemente à extremidade funcionalizada do PEG. Na preparação dos lipossomas

direcionados, a inserção do antagonista G foi realizada por dois métodos diferentes – direto (DirLipNeut) e pós-inserção (PosInsLipNeut) para o caso dos lipossomas com lípidos neutros – e por um método de ligação – pós-inserção (PosInsLipCat) – no caso dos lipossomas com lípidos catiónicos.

2.1.1. Formulações lipossomais com lípidos neutros (NDLipNeut)

Uma mistura de EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ na razão molar 68,25:30,5:1,25 foi dissolvida em clorofórmio num balão de fundo redondo. O solvente foi evaporado à secura no evaporador rotativo (*Rotavapor RE-111 – Buchi*, Suíça), formando-se um filme lipídico que foi posteriormente hidratado com o volume adequado de tampão citrato a 10 mM em NaCl a 145 mM, pH 6,0 para se obter uma concentração lipídica final de 20 mM. A hidratação foi feita sob agitação num vórtex e na presença de esferas de vidro, formando-se vesículas multilamelares (MLVs) que foram extrusadas no extrusor *Lipex™ Thermobarrel Extruder*, passando sequencialmente por filtros *Nucleopore® Track-Etched Membranes* (Whatman®, EUA) de 600, 400 e 200 nm de diâmetro de poro, três vezes pelo filtro de 100 nm e uma vez pelo filtro de 50 nm de diâmetro de poro. Os lipossomas obtidos – denominados VETs (*vesicles obtained through extrusion techniques*) – foram ainda ultracentrifugados a 300 000 x g, durante 2 h, a 15 °C na ultracentrifuga *Optima™ XL-90 Ultracentrifuge* (Beckman Coulter, EUA) com um rotor do tipo 70 Ti, ressuspensos no mesmo tampão em que tinham sido preparados e caracterizados quanto ao seu tamanho, carga e concentração lipídica.

2.1.2. Formulações lipossomais com lípidos catiónicos (NDLipCat)

Foram preparadas soluções *stock* em etanol de DSPC, Chol e DODAP a 20 g/L e de DSPE-PEG₂₀₀₀ a 50 g/L. Dessas soluções adicionou-se num tubo de ensaio com recurso a uma seringa de vidro os volumes apropriados de modo a obter uma mistura de DSPC:Chol:DODAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ na razão molar 20:45:25:8 para um total de 13 µmol de lípido. É de salientar que, na mistura lipídica para este passo, é necessário ter um volume constituído por 40 % de etanol e 60 % tampão citrato a 300 mM, pH 4,0. Foi então necessário perfazer o volume de etanol de modo a se obterem os 40% do volume final. Noutro tubo de ensaio adicionou-se o volume de tampão citrato a 300 mM, pH 4,0 que corresponde aos restantes 60 % do volume final. Os dois tubos foram selados com parafilme e colocados a aquecer a 65 °C durante 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se, gota a gota, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, a mistura de lípidos ao tampão citrato a 300 mM, pH 4,0, enquanto este estava em permanente agitação num vórtex e, de seguida, a formulação foi extrusada a 65 °C no extrusor *Lipex™ Thermobarrel Extruder*, passando dez vezes pelo filtro *Nucleopore® Track-Etched Membranes* (Whatman®, EUA) com 100 nm de diâmetro de poro. Os VETs resultantes desta extrusão sofreram ainda duas diálises numa manga com um *cut-off* de 12 – 14 kDa: a primeira foi realizada com tampão citrato a 300 mM, pH 4,0 durante 2 h de modo a remover o etanol que a formulação ainda pudesse ter; a segunda, foi realizada em tampão citrato a 10 mM em NaCl 145 mM, pH 6,0, durante a noite, de modo a que no final tanto os NDLipCat como os NDLipNeut estivessem no mesmo tampão, para que nos ensaios *in vitro* a única diferença fosse o tipo de formulação lipossomal adicionada às células. Por fim, os lipossomas foram ultracentrifugados a 300 000 x g, durante 2 h, a 15 °C na ultracentrifuga *Optima™ XL-90 Ultracentrifuge* (Beckman Coulter, EUA) com um rotor do tipo 70 Ti, tendo-se feito a ressuspensão no tampão utilizado na última diálise e procedeu-se à caracterização dos lipossomas quanto ao seu tamanho, carga, concentração lipídica.

2.2. Direcionamento de formulações lipossomais com antagonista G

2.2.1. Ativação do antagonista G com um grupo sulfidrilo

Para que o antagonista G seja capaz de se ligar aos lipossomas primeiro tem que ser ativado. Essa ativação consiste na tiolação do N-terminal do péptido por uma molécula de 2-iminotiolano (reagente de *Traut*), ficando então o antagonista G com um grupo sulfidrilo (Figura III.1), que é capaz de reagir com a maleimida. Para isso foi preparada uma solução *stock* de antagonista G a 5 mM em água e uma solução de 2-iminotiolano a 20 mM em tampão HEPES a 25 mM em NaCl a 140 mM, pH 8,0, tendo-se adicionado o volume adequado das duas soluções de modo a ter-se uma razão molar péptido:2-iminotiolano de 1:4. A reação de tiolação ocorreu durante 1 hora, à temperatura ambiente e com agitação ocasional, no interior de um recipiente de vidro revestido por organopolisiloxano (Sigmacote®, Sigma) – evita que o péptido na sua forma livre interaja com o vidro – tendo o recipiente sido fechado sob fluxo de N₂. Após esse tempo de incubação, o N-terminal do antagonista G tem um grupo sulfidrilo, sendo então capaz de se ligar aos lipossomas quer utilizando o método direto quer o método de pós-inserção.

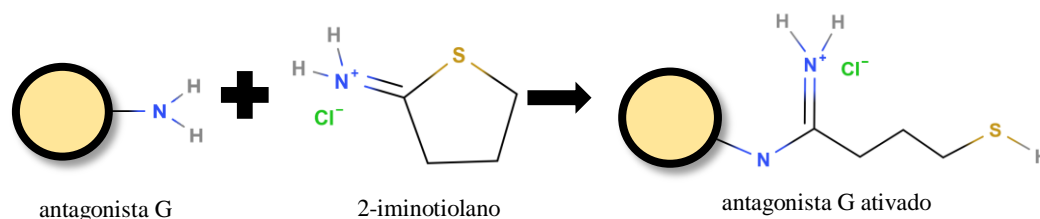


Figura III.1 – Esquema da reação do antagonista G com o 2-iminotiolano.

2.2.2. Ligação do antagonista G aos lipossomas pelo método direto (DirLipNeut)

Este método de ligação só foi utilizado nas formulações com lípidos neutros, tendo sido preparados lipossomas segundo o método da hidratação do filme lipídico descrito anteriormente para esta formulação, sem se centrifugar. A formulação lipídica usada foi EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀: DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida na razão molar 68,25:30,5:0,55:0,70.

O antagonista G ativado foi adicionado aos lipossomas pré-formados em tampão citrato a 10 mM em NaCl a 145 mM, pH 6,0 na razão péptido:maleimida de 1,4:1, deixando-se a reação de ligação ocorrer durante a noite (12 – 18 h) à temperatura ambiente num recipiente fechado sob fluxo de N₂. Posteriormente, de forma a remover o péptido não ligado, os lipossomas foram ultracentrifugados a 300 000 x g, durante 2 h, a 15 °C na ultracentrifuga *Optima™ XL-90 Ultracentrifuge* (Beckman Coulter, EUA) com um rotor do tipo 70 Ti e foram ressuspensos no mesmo tampão. Após esta purificação dos lipossomas DirLipNeut, procedeu-se à sua caracterização nomeadamente quanto ao seu tamanho, carga, concentração lipídica e quantidade de antagonista G ligado.

2.2.3. Ligação do antagonista G pelo método de pós-inserção

Para o método de pós-inserção é necessário proceder-se à preparação micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida⁹¹. É nestas micelas que ocorre a ligação covalente do antagonista G ativado (Figura III.2) e, posteriormente, procede-se à inserção dos lípidos micelares com antagonista G ligado nos lipossomas pré-formados⁸³.

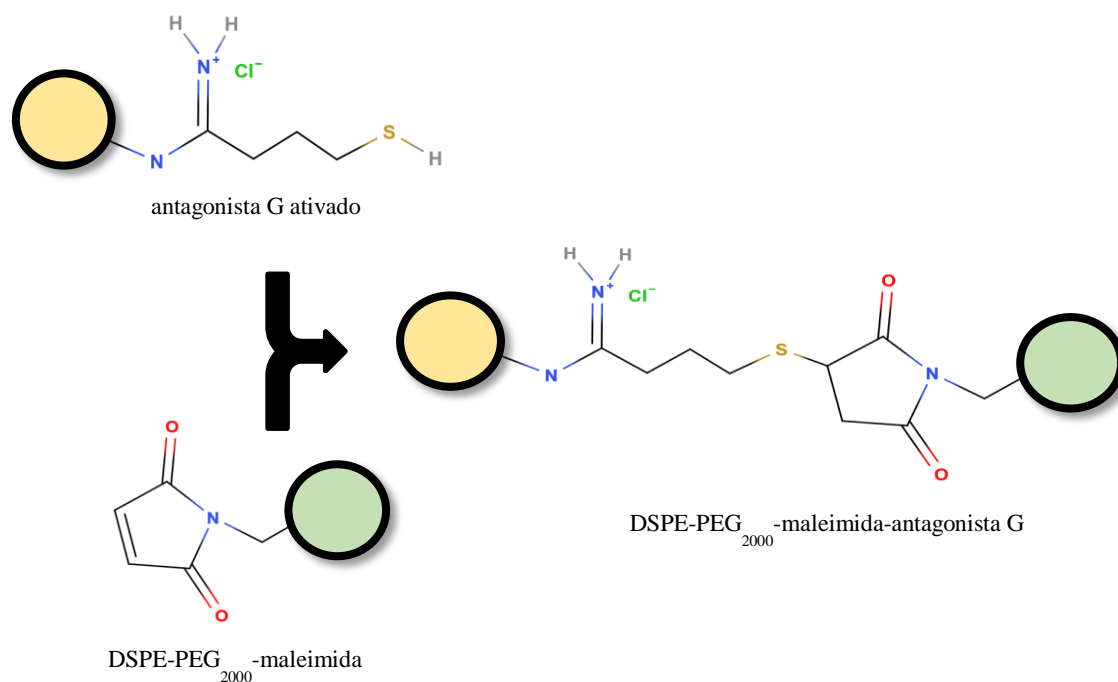


Figura III.2 – Esquema da reação entre o antagonista G ativado e o DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida.

Este método foi utilizado para ligar o antagonista G nos dois tipos de formulação (NDLipNeut e NDLipCat), havendo ligeiras diferenças nos procedimentos, nomeadamente na fração molar de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida usada nas micelas.

2.2.3.1. Formulações com lípidos neutros direcionadas (PosInsLipNeut)

Os lipossomas foram preparados segundo o método da hidratação do filme lipídico descrito anteriormente no caso das formulações com lípidos neutros. A formulação lipídica usada foi EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ na razão molar 68,25:30,5:0,55.

De forma a manter a mesma razão molar utilizada no método direto, a quantidade DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida usada foi a correspondente a 0,70 % mol de lípido. Dissolveu-se essa quantidade de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida em clorofórmio num tubo de ensaio e evaporou-se à secura sob fluxo de N₂. O filme formado foi hidratado com o volume adequado de tampão HEPES a 25 mM, MES a 25 mM em NaCl a 140 mM, pH 6,5 de modo a

ter-se uma concentração lipídica de 0,5 mM – valor acima da concentração micelar crítica do DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida, garantindo-se assim a formação de micelas. À suspensão de micelas formada adicionou-se o antagonista G ativado na razão molar péptido:maleimida de 1,4:1 e deixou-se a reação de ligação ocorrer durante a noite (12 – 18 h), à temperatura ambiente, num recipiente fechado sob fluxo de N₂. No final do período de incubação obtiveram-se então micelas com DSPE-PEG₂₀₀₀-antagonista G.

A suspensão de micelas com DSPE-PEG₂₀₀₀-antagonista G foi adicionada aos lipossomas previamente preparados, deixando-se a reação de inserção ocorrer durante 1 h à temperatura ambiente. De seguida purificaram-se os lipossomas através de uma ultracentrifugação a 300 000 x g, durante 2 h, a 15 °C na ultracentrifuga *Optima™ XL-90 Ultracentrifuge* (Beckman Coulter, EUA) com um rotor do tipo 70 Ti, tendo-se feito a ressuspensão no mesmo tampão onde os lipossomas PosInsLipNeut tinham sido preparados. Por fim, procedeu-se à caracterização dos lipossomas quanto ao seu tamanho, carga, concentração lipídica e quantidade de péptido ligado.

2.2.3.2. Formulações com lípidos catiónicos direcionadas (PosInsLipCat)

Os lipossomas foram preparados segundo o método descrito anteriormente no caso das formulações com lípidos catiónicos⁹² (NDLipCat) e a formulação lipídica usada foi exatamente a mesma, contudo o procedimento não foi seguido até ao fim, tendo-se parado a seguir à extrusão da formulação.

Foram preparadas micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida pelo método da hidratação do filme lipídico, tal como descrito para a formulação com lípidos neutros. A única alteração foi a quantidade de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida usada, que neste caso correspondeu a 2 % mol de lípido.

A suspensão de micelas com DSPE-PEG₂₀₀₀-antagonista G foi adicionada aos lipossomas previamente preparados, deixando-se a reação de inserção ocorrer durante 1 h à temperatura ambiente. De seguida retomaram-se os passos que sucediam a extrusão no método descrito para os NDLipCat, nomeadamente as duas diálises e a ultracentrifugação exatamente nas mesmas condições, obtendo-se assim os PosInsLipCat, e por fim a caracterização, que desta vez incluiu também a quantidade de antagonista G ligado.

2.3. Marcação das formulações lipossomais com rodamina B

No caso dos lipossomas utilizados nos ensaios de internalização em células H69 foi necessário adicionar às formulações fosfatidiletanolamina marcada com rodamina B (Rhod) – 0,25 mol% relativamente ao lípido total. O método de preparação foi semelhante ao descrito para os lipossomas sem marcação fluorescente, sendo que a única alteração consiste na adição de um passo de filtração por um filtro estéril de PTFE com 0,2 µm de diâmetro de poro, de modo a esterilizar as formulações lipossomais visto que estas vão ser aplicadas em culturas celulares.

2.4. Caraterização das formulações lipossomais

2.4.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas

O tamanho médio das nanopartículas preparadas foi determinado por espectrometria de correlação fotónica (*DLS*, explicada mais detalhadamente na introdução) no aparelho *Zetasizer Nano S* (*Malvern Instruments*, Reino Unido). Para isso, amostras das formulações lipossomais preparadas foram diluídas para uma concentração de 3 $\mu\text{mol/mL}$ com o tampão em que estavam preparadas e foi medido o seu raio hidrodinâmico médio e respetivo índice de polidispersão (PDI), sendo que o resultado obtido para cada uma das amostras consiste no valor mediano de três medições. O índice de polidispersão serve como medida de homogeneidade do raio hidrodinâmico das nanopartículas, variando entre 0 (população monodispersa) e 1 (população polidispersa). Valores de PDI abaixo de 0,2 usualmente são considerados satisfatórios para uma preparação lipossomal, contudo se forem inferiores a 0,05 indicam populações quase homogêneas relativamente ao diâmetro médio obtido.

2.4.2. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta (ζ) das nanopartículas preparadas foi determinado por *Laser Doppler Velocimetry* (LDV, explicada mais aprofundadamente na introdução) com o aparelho *Zetasizer Nano Z* (*Malvern Instruments*, Reino Unido). As amostras foram preparadas da mesma forma que a descrita para a determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.

2.4.3. Quantificação do teor lipídico

A concentração lipídica das formulações lipossomais preparadas foi determinada através do método de Rouser⁹³, que é um método de doseamento de fosfatos. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio e evaporadas à secura num banho seco a 180 °C. De seguida fez-se a sua digestão ácida com ácido perclórico a 70 % (v/v) durante 45 min, no banho seco a 180 °C, tapando-se os tubos com berlindes de vidro de modo a evitar perdas de volume. Após os tubos arrefecerem adicionou-se pela ordem descrita: 1 mL de água destilada, 0,4 mL de molibdato de amónio 1,25 % (m/v) e 0,4 mL de ácido ascórbico 5 % (m/v) preparado de fresco e agitou-se de imediato vigorosamente. Por fim, os tubos foram a incubar num banho a 100 °C durante 5 min e, após arrefecerem, leu-se a absorvência a 797 nm no espectrofotómetro *Spectrophotometer UV-mini 1240* (*Shimadzu*). O mesmo procedimento foi aplicado na curva de calibração, constituída por diluições entre 10 e 40 μM de um padrão de fosfato de sódio 0,5 mM.

2.4.4. Doseamento do antagonista G

A determinação da quantidade de antagonista G ligado às formulações lipossomais direcionadas foi realizada através de espectroscopia de fluorescência, medindo-se a intensidade de emissão de fluorescência a 330nm, com excitação a 288 nm e larguras de banda de excitação e emissão de 5 nm no aparelho *Hitachi F-3000*

Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Corporation, Tóquio, Japão). Imediatamente antes de se medir a intensidade de fluorescência das amostras destruiu-se os lipossomas com metanol a 90 % (v/v), que interfere pouco com a fluorescência do péptido.

A curva de calibração foi preparada com diluições entre 0,4 e 2,1 μM da solução *stock* de antagonista G 5 mM, às quais foram adicionados lipossomas não direcionados com uma concentração lipídica idêntica à das amostras para eliminar possíveis interferências, tendo-se seguido o mesmo procedimento descrito para as amostras.

2.4.5. Quantificação da rodamina B por fluorescência

No caso dos lipossomas utilizados nos ensaios *in vitro* foi necessário adicionar às formulações fosfatidiletanolamina marcada com rodamina B (Rhod), visto que, como a rodamina B possui um anel xaneno na sua estrutura, tem a capacidade de emitir fluorescência, conferindo assim uma marcação fluorescente aos lipossomas⁹⁴. Essa marcação é importante para as técnicas de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo pois é o que vai permitir identificar se houve internalização dos lipossomas pelas células. É de referir que, para que a análise dos resultados destas técnicas seja fiável, a quantidade de rodamina existente nas diversas formulações tem de ser da mesma ordem de grandeza. Assim, para amostras com a mesma concentração lipídica, quantificou-se a rodamina B por espectroscopia de fluorescência, medindo-se a intensidade de emissão a 580 nm, com excitação a 560 nm e largura de bandas de excitação e emissão de 5 nm no espectralfluorímetro *Hitachi F-3000 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi High-Technologies Corporation, Tóquio, Japão)*. Imediatamente antes de se medir a fluorescência das amostras, destruiu-se os lipossomas com etanol – que permite obter um rendimento quântico da rodamina B maior que o metanol⁹⁵.

2.5. Ensaios de internalização de lipossomas na linha celular H69

Como a linha celular H69 cresce em suspensão analisou-se a internalização de lipossomas tanto em células não fixadas como fixadas. As células não fixadas têm como vantagem permanecerem intactas, visto que não são expostas a nenhum composto que pode afetar, por exemplo, a sua integridade ou metabolismo, contudo tem como principal desvantagem a sua observação ter que ocorrer num curto espaço de tempo após a sua preparação pois, caso contrário, podem começar a sofrer alterações a ponto de se começarem a deteriorar. No caso deste estudo, é importante que as vias de endocitose e exocitose das células não sofram alterações visto que isso iria originar falsos resultados quanto à internalização dos lipossomas.

Já as células fixadas têm a vantagem de se poder guardar as preparações para observar quando for mais conveniente, uma vez que a partir do momento em que se adicionou o agente fixante – neste caso o paraformaldeído – há a preservação da arquitetura da célula mantendo-se os seus componentes num estado semelhante ao que existia antes da fixação⁹⁶. Neste estudo, esse aspeto é relevante pois significa que deixa de ocorrer transporte quer para o interior como para o exterior das células, mantendo-se fixa não só a quantidade de lipossomas que tinham sido internalizados por esta, como a sua localização intracelular.

2.5.1. Contraste de fase e microscopia de fluorescência em células não fixadas

As células H69, após terem sido desagregadas com uma pipeta de 5 mL, foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço em meio RPMI-1640 suplementado com FBS 10 %, penicilina-estreptomicina 100 U/mL e 2 mM de L-glutamina contendo 250 μ M de lipossomas não direcionados (NDLipNeut e NDLipCat) ou direcionados com antagonista G (DirLipNeut, PosInsLipNeut, PosInsLipCat) e incubadas durante 1 ou 3 h na estufa a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂. Após o período de incubação, adicionou-se a cada poço 1 mL de PBS a 4 °C, transferiu-se o seu conteúdo para *Eppendorfs* e centrifugou-se a 134 x g durante 5 min na centrífuga *Eppendorf® Microcentrifuge 5415D* (Hamburgo, Alemanha). Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 500 μ L de PBS a 4 °C e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições, repetindo-se mais uma vez a ressuspensão em PBS e a centrifugação. No final desta terceira centrifugação e após remover o sobrenadante, ressuspenderam-se as células no volume residual que tinha ficado no *Eppendorf*.

De seguida, uma gota da suspensão celular foi aplicada na lâmina, cobriu-se com uma lamela e a preparação foi imediatamente observada no microscópio de fluorescência *Olympus BX41* (objetiva *PlanApo*, de 60 x de ampliação), com lâmpada de fluorescência *Olympus U-RFL-T* (Japão). As fotografias foram adquiridas com a câmara digital *Olympus CAMEDIA C-4040 ZOOM* através do programa *Cam2Com 4.1 – Digital Camera Control Software, Sabsic*, no qual se escolheu o tempo de exposição e a abertura da lente da câmara mais adequados consoante se estava a utilizar a fluorescência ou o contraste de fase. As condições escolhidas mantiveram-se constantes de modo a que fosse possível a comparação das diversas imagens na análise qualitativa da internalização de lipossomas e foram as seguintes: abertura de lente de 2,8 e tempo de exposição de 1/6 s no contraste de fase; abertura de lente de 3,2 e tempo de exposição de 1/5 s na microscopia de fluorescência da rodamina B e abertura de lente de 3,2 e tempo de exposição de 1/400 s na microscopia de fluorescência do DAPI.

2.5.2. Contraste de fase e microscopia de fluorescência em células fixadas

No caso das células fixadas, para que estas aderissem teve que se revestir as lamelas com poli-L-lisina (Sigma – *St. Louis*, EUA). Para isso, numa placa de 24 poços, pôs-se uma lamela redonda por poço e colocou-se a poli-L-lisina de modo a cobrir toda a lamela. Deixou-se repousar pelo menos 30 min e, no final desse tempo, removeu-se toda a solução, ficando as lamelas prontas para se adicionar a suspensão de células.

O procedimento aplicado às células foi igual ao descrito no caso das células não fixadas, mas no final da última centrifugação, após se ressuspender, colocou-se todo o volume da suspensão celular na lamela revestida e deixou-se repousar alguns minutos. De seguida as células foram lavadas com 500 μ L de PBS a 4 °C e fixadas com 250 μ L de paraformaldeído (PFA) a 3,7 % (m/v) em PBS, durante 10 min. Após se retirar o PFA, adicionou-se 200 μ L de DAPI (diluição 1/1000) durante 3 min para corar o DNA de cadeia dupla marcando assim os núcleos das células. Após esta marcação fez-se uma nova lavagem com 500 μ L de PBS a 4 °C, removeu-se todo o líquido e montou-se as lamelas, com a parte revestida para baixo, em meio de montagem Mowiol® sobre lâminas de vidro. Por fim, selaram-se as preparações com verniz, que foram observadas no microscópio de fluorescência, tendo-se tirado fotografias tal como descrito para as células não fixadas.

2.5.3. Citometria de fluxo em células não fixadas

Como para a citometria de fluxo é necessário células individuais e a linha celular H69 cresce em agregados, a desagregação foi feita de uma forma distinta da utilizada na microscopia de fluorescência. Assim, para desagregar bem as células primeiro deixou-se assentar os agregados em tubos *Falcon* de 15 mL, removendo-se quase a totalidade do sobrenadante, e desagregou-se com a ponta de uma micropipeta de 1 mL. Depois transferiu-se as células para um frasco de cultura de 25 cm², adicionou-se 5 mL de PBS e incubou-se a 37 °C durante 5 min. Transferiu-se novamente a suspensão para um tubo *Falcon* de 15 mL, centrifugou-se na centrífuga *Beckman GPR Centrifuge* (Beckman Coulter, EUA) com o rotor GH-3.8 a 41 x g, 5 min e removeu-se o PBS. De seguida adicionou-se, gota a gota, 3 mL de TrypLE™ Express e transferiu-se novamente a suspensão celular para o frasco de cultura e pôs-se a incubar a 37 °C durante 10 min. No final dessa incubação, adicionou-se 6 mL de RPMI-1640 suplementado com 10 % de FBS, penicilina-estreptomicina 100 U/mL e 2 mM de L-glutamina – denominado RMPI completo – e centrifugou-se a 162 x g, durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se em RPMI completo. Neste ponto, já se tem células H69 individuais, procedendo-se então ao seu plaqueamento em placas de 24 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço em meio RPMI completo contendo lipossomas, tanto com lípidos neutros como catiónicos, não direcionados ou direcionados com antagonista G (preparados pelo método direto ou de pós-inserção) à concentração lipídica que se pretender, deixando-se incubar durante 1 h na estufa a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO₂. Após o período de incubação, adicionou-se a cada poço 1 mL de PBS a 4 °C, transferiu-se o seu conteúdo para tubos *Falcon* de 15 mL e centrifugou-se a 162 x g durante 5 min na centrífuga *Beckman GPR Centrifuge* (Beckman Coulter, EUA) com o rotor GH-3.8. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se em 1 mL de PBS a 4 °C e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições, repetindo-se mais uma vez a ressuspensão em PBS e a centrifugação. No final desta terceira centrifugação e após remover o sobrenadante, ressuspendeu-se as células em 750 µL de PBS e transferiu-se para um *Eppendorf* de 1,5 mL. A suspensão celular foi então analisada por citometria de fluxo com focalização acústica no aparelho *Applied Biosystems® Attune™ Acoustic Focusing Cytometer* (Life Technologies – Carlsbad, California) com laser de excitação a 488 nm e com recurso ao filtro BL2, que tem uma gama de emissão entre 561 e 587 nm. Os dados foram obtidos e analisados no software *Attune® Cytometric Software v2.1*, *Applied Biosystems*.

IV. Resultados e discussão

1. Notas introdutórias

O carcinoma de pequenas células do pulmão (SCLC) é um tipo de carcinoma muito agressivo e ainda não está implementado clinicamente um tratamento eficaz ou um tratamento que melhore substancialmente a expectativa média de vida dos pacientes afetados por este cancro. No entanto, a nível da investigação estão a ser exploradas abordagens distintas, quer a nível de combinações de terapias já existentes quer no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Uma das estratégias exploradas envolve os sistemas de veiculação de fármacos como terapia para diversas patologias, uma vez que são capazes de transportar vários tipos de compostos e de os libertar de forma controlada. Idealmente estes sistemas conseguem ainda libertar os compostos no local desejado, sendo as suas características ajustadas de modo a tornar isso possível, quer seja através de estratégia mais simples, como a utilização de sistemas facilmente reconhecidos pelo MPS, ou mais complexas, como a incorporação de agentes de direcionamento específicos.

Neste estudo recorreu-se a um sistema lipossomal mais complexo, que possui direcionamento ativo para um alvo específico. Como no SCLC existem recetores de neuropéptidos com função de fatores de crescimento que estão sobre-expressos, o péptido escolhido para direcionar os lipossomas foi o antagonista G que, enquanto antagonista de largo espetro, é reconhecido por vários desses recetores sobre-expressos. Este péptido foi ligado por dois métodos distintos aos lipossomas (direto e de pós-inserção) e foram preparadas formulações lipossomais com lípidos neutros e catiónicos de forma a investigar se a composição dos lipossomas afetava a sua capacidade de direcionamento. Foram escolhidos estes dois tipos de lípidos pois possibilitam o transporte eficaz de compostos distintos: os lípidos neutros geralmente são utilizados para transporte de fármacos, enquanto os lípidos catiónicos foram especificamente criados para transporte de material genético, devido à interação entre as cargas opostas.

Mesmo que os sistemas de veiculação de fármacos atinjam o seu alvo, pode ser necessário que sejam endocitados pelas células para que a libertação dos compostos ocorra no interior da célula. Assim, para além de se estudar a preparação dos sistemas lipossomais direcionados com antagonista G, estudou-se também a capacidade destes serem internalizados pelas células H69 – linha celular clássica de SCLC.

2. Lipossomas de longo tempo de circulação não direccionados

2.1. Lipossomas com lípidos neutros (NDLipNeut)

A composição e proporção de lípidos usados na formulação lipossomal dos NDLipNeut foram otimizados por Corvo e colegas⁹⁷, tendo sido demonstrado que a formulação lipossomal possuía elevada estabilidade e um bom perfil *in vivo*.

Estes lipossomas foram preparados e caracterizados quanto ao seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e quantidade de lípido (Tabela IV.1).

Tabela IV.1 – Caracterização dos NDLipNeut. Os valores da média \pm desvio padrão para o diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e concentração lipídica dos lipossomas com lípidos neutros sem direcionamento com longo tempo de circulação foram obtidos para 3 experiências independentes ($n=3$).

Lipossomas	Passo	D_H (μm)	PDI	ζ (mV) ^a	[Lípido] (mM)
NDLipNeut	Após hidratação	$1,30 \pm 0,01$	$0,498 \pm 0,001$	-	$17,1 \pm 0,6$
	Após 3 x filtro 100 nm	$0,15 \pm 0,01$	$0,076 \pm 0,001$	-	$15,8 \pm 0,3$
	Após ultracentrifugação	$0,16 \pm 0,01$	$0,082 \pm 0,004$	$-1,87 \pm 0,52$	$14,8 \pm 0,4$

Composição dos NDLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ na razão molar (68,25:30,5:1,25)

^a medido a pH 6,0

O potencial zeta dos lipossomas só foi medido após estes terem sido purificados, uma vez que antes disso podiam haver compostos associados não especificamente à superfície dos lipossomas, falseando os valores obtidos. Como os lípidos que constituíam a formulação eram neutros e havia ainda o revestimento dos lipossomas pelo PEG₂₀₀₀, que tem a capacidade de neutralizar a carga mesmo que os lípidos sejam carregados, o potencial ζ dos lipossomas está perto da neutralidade (valores até ± 4 mV são considerados neutros), tal como seria expectável.

É de referir que na determinação da quantidade de lípido, como se recorreu a um método que doseia fosfatos⁹³, o que na realidade se fica a saber é a quantidade de fosfolípidos presente nas amostras, tendo depois que se fazer uma extrapolação para a concentração de lípidos total consoante a formulação utilizada. Ao fazer a extrapolação, está-se a admitir que as perdas de fosfolípido que ocorrem durante o processo de preparação são equivalentes às que ocorrem nos restantes componentes da membrana, ou seja, que as razões molares iniciais se mantêm constantes.

De forma a observar se ocorria efetivamente a diminuição do tamanho dos lipossomas ao longo do processo de extrusão sequencial, mediu-se o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão após a passagem dos NDLipNeut por cada um dos filtros com diâmetro de poro diferente (Tabela IV.2).

Tabela IV.2 – Caracterização das formulações de NDLipNeut ao longo da extrusão. Os valores para o diâmetro hidrodinâmico (D_H) e índice de polidispersão (PDI) dos NDLipNeut foram obtidos para uma experiência representativa.

Lipossomas	Composição lipídica (razão molar)	Passo	D_H (μm)	PDI
NDLipNeut	EPC:Chol:DSPE-PEG ₂₀₀₀ (68,25:30,5:1,25)	Após hidratação	1,32	0,344
		Após filtro 600 nm	0,81	0,341
		Após filtro 400 nm	0,46	0,262
		Após filtro 200 nm	0,21	0,150
		Após 3 x filtro 100 nm	0,15	0,071

Pela análise da Tabela IV.2 é possível observar que a extrusão sequencial utilizada durante a preparação dos NDLipNeut permite que o tamanho e a homogeneização da população de lipossomas diminuam gradualmente, conseguindo-se obter lipossomas com um diâmetro em torno dos 0,15 μm e com um índice de polidispersão bastante baixo ($< 0,100$).

2.2. Lipossomas com lípidos catiónicos (NDLipCat)

No caso dos NDLipCat, a sua composição foi baseada na formulação desenvolvida por Semple e colegas⁹² e tem a vantagem de ser capaz de encapsular grandes quantidades de material genético, nomeadamente oligonucleótidos antissentido. Esta formulação foi também preparada e caracterizada quando ao seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e quantidade de lípido (Tabela IV.3).

Tabela IV.3 – Caracterização das formulações de NDLipCat. Os valores da média \pm desvio padrão para o diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e concentração lipídica dos NDLipCat foram obtidos para duas experiências independentes ($n=2$).

Lipossomas	Passo	D_H (μm)	PDI	ζ (mV) ^a	[Lípido] (mM)
NDLipCat	Após 10 x filtro 100 nm	$0,10 \pm 0,01$	$0,058 \pm 0,017$	-	$11,6 \pm 0,5$
	Após ultracentrifugação	$0,09 \pm 0,01$	$0,112 \pm 0,055$	$-1,41 \pm 0,41$	$10,0 \pm 0,5$

Composição dos NDLipCat – DSPC:Chol:DODAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ na razão molar (20:45:25:8)

^a medido a pH 6,0

Como na determinação da quantidade de lípido se faz uma extrapolação a partir do doseamento de fosfatos e nesta formulação a quantidade de fosfolípidos presente é menor que nos lipossomas com lípidos neutros (28 vs. 69.5 % mol), este método pode originar um erro maior.

Nos NDLipCat a extrusão não foi feita de forma sequencial, mas sim com elevado número de passagem pelo mesmo filtro. Devido à composição e à temperatura utilizada na extrusão destes lipossomas (60 °C) – que é superior à temperatura de transição de fase (T_f) do lípido que possui a T_f mais elevada⁹⁸ – a membrana lipossomal está bastante fluída, conseguindo-se deformar de forma a passar pelos poros maiores dos filtros sem oferecer resistência. Assim, pode iniciar-se a extrusão logo pelo filtro com 100 nm de diâmetro de poro. A repetição da passagem por esse filtro é então feita diversas vezes para assegurar que o tamanho dos lipossomas está efetivamente a reduzir e que há a homogeneização da distribuição dos tamanhos, como é visível na Tabela IV.3. Apesar de na sua composição existirem lípidos com carga positiva, nomeadamente o DODAP, a presença do PEG₂₀₀₀ leva a que o valor da carga superficial (potencial ζ) dos lipossomas seja perto da neutralidade evidenciando a capacidade deste de mascarar a carga.

3. Lipossomas de longo tempo de circulação direccionados

3.1. Antagonista G

Para ocorrer a ligação do antagonista G ao DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida é crucial que haja a ativação do primeiro. Todavia, não foi necessário alterar esse protocolo pois os passos críticos para que a reação de ativação tenha sucesso foram cumpridos, nomeadamente a utilização de um tampão com pH 8,0 (que é o pH a que a reação ocorre preferencialmente⁹⁴), a estequiometria de 1 molécula de antagonista G para 4 moléculas de 2-iminotiolano, garantindo que todas as moléculas de péptido são ativadas, a utilização de um recipiente de vidro revestido com um composto que neutraliza os grupos silanol, evitando que o antagonista G livre interaja com eles, e a utilização imediata do antagonista G após a sua ativação, pois caso se demore muito tempo,

pode-se perder grande parte da reatividade do antagonista G devido à reciclagem do grupo sulfidrílico⁹⁴, deixando então o antagonista G de ser capaz de reagir com a maleimida (Figura IV.1).

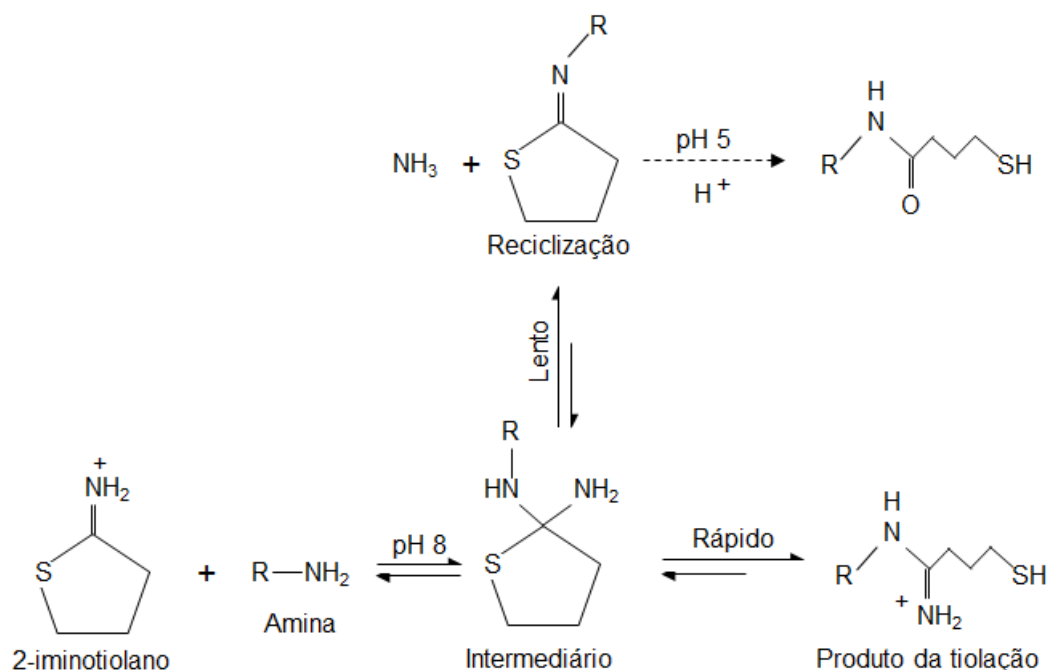


Figura IV.1 – Esquema das reações que podem ocorrer quando o 2-iminotilano reage com uma molécula que contém uma amina primária, como o antagonista G, ao pH preferencial da reação. Adaptado de ⁹⁴.

Após haver a ativação do antagonista G, o passo mais importante na preparação dos lipossomas direcionados consiste na sua ligação, então otimizou-se o protocolo de modo a que no final se conseguisse maximizar a quantidade de antagonista G efetivamente ligado aos lipossomas. Para isso, testou-se o período de incubação dos lipossomas com as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-antagonista G e o tamanho mais adequado para os lipossomas.

3.1.1. Estudo do método de doseamento do antagonista G na presença de lipossomas

Para dosear o antagonista G ligado às formulações lipossomais, recorreu-se à técnica de espectroscopia de fluorescência uma vez que existem resíduos de aminoácidos aromáticos na sequência do hexapéptido. De forma a doseá-lo corretamente na curva de calibração, adicionou-se uma concentração de lipossomas semelhante à presente nas amostras a dosear, para evitar interferências na fluorescência. Como a presença de lipossomas, ainda que estes estejam destruídos devido à adição de metanol – e, portanto, supostamente não levem à dispersão da luz incidente – pode deslocar o pico dos comprimentos de onda de excitação e emissão, foram traçados os espectros de excitação e emissão (Figura IV.2) tanto de uma amostra de lipossomas com lípidos neutros como de duas diluições de antagonista G livre, para ver quais os comprimentos de onda mais adequados para o doseamento do péptido ligado.

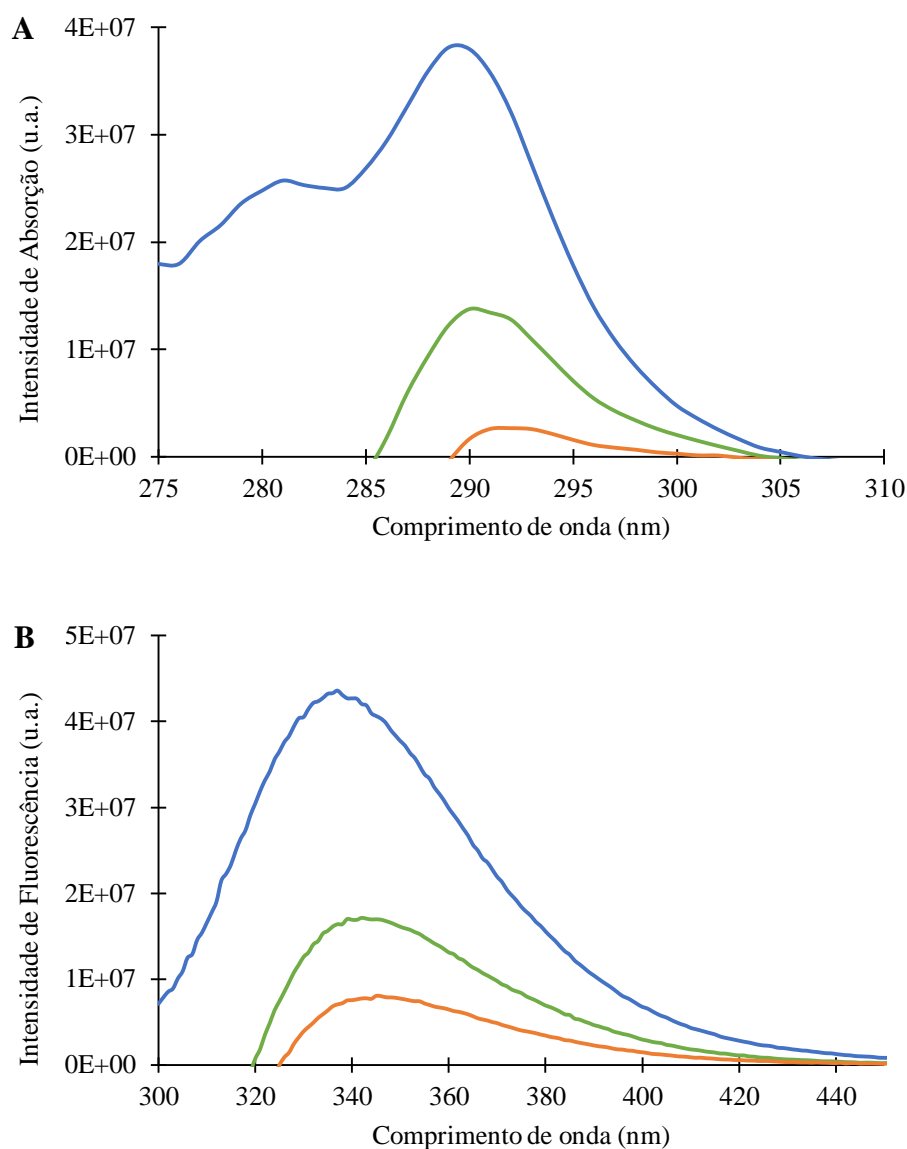


Figura IV.2 - Espectros de excitação (A) e emissão (B) de duas concentrações de antagonista G diferentes – 0,8 µg/mL (verde) e 2 µg/mL (azul) – e de uma amostra de lipossomas com lípidos neutros (laranja) (após a subtração do branco: NDLipNeut em tampão citrato a 10 mM em NaCl a 145 mM, pH 6,0) com comprimentos de onda de emissão a 330 nm e excitação a 288 nm, respetivamente. Intensidade de absorção e fluorescência em unidades arbitrárias (u.a.).

A partir da análise dos espectros obtidos, optou-se por fazer o doseamento do antagonista G usando os comprimentos de onda 288 nm (excitação) e 330 nm (emissão) pois, para além de estarem em concordância com os picos obtidos nos espectros, foram também os utilizados para dosear o antagonista G noutros estudos^{99,100}.

Esses comprimentos de onda foram então utilizados para realizar as medidas quantitativas de intensidade de fluorescência das amostras da suspensão lipossomal e das diluições de antagonista G livre da curva de calibração (Figura IV.3), utilizando-se uma largura de banda de 5 nm tanto para a excitação como para a emissão.

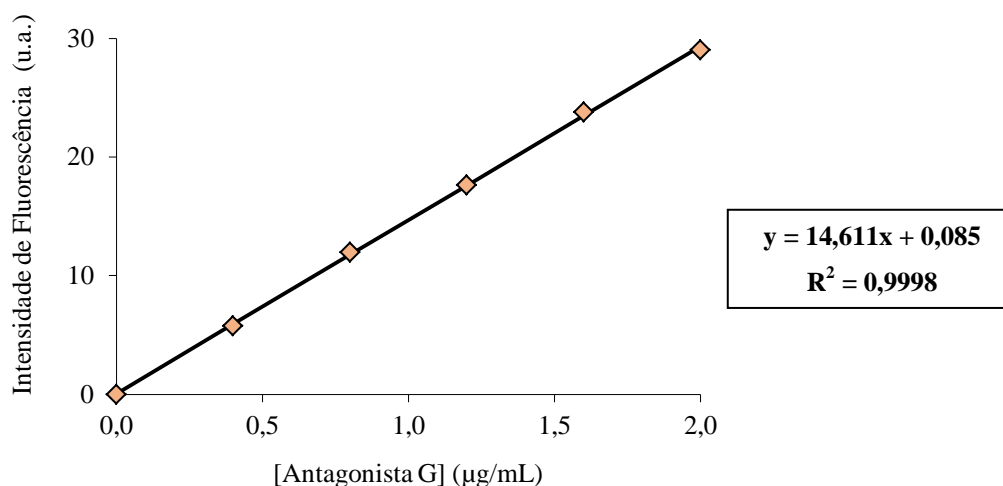


Figura IV.3 – Curva de calibração representativa para o doseamento do antagonista G ligado aos lipossomas, obtida por espectroscopia de fluorescência com comprimentos de onda de excitação a 288 nm e emissão a 330 nm e largura de bandas de 5 nm para ambos. Intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (u.a.)

Como é visível na Figura IV.3, o comportamento obtido na curva de calibração é linear, podendo então dosear-se o antagonista G das amostras por este método, desde que os valores obtidos estejam dentro da gama de valores incluídos na reta.

3.1.2. Estudo da influência do diâmetro dos lipossomas na ligação ao antagonista G

O outro fator que poderia afetar a quantidade de antagonista G ligado aos lipossomas é o tamanho destes, devido à influência que o tamanho tem na área superficial e a sua relação com a quantidade de maleimida disponível para ligação (método direto) ou área disponível para a inserção dos lípidos micelares (método da pós-inserção). Assim sendo, prepararam-se lipossomas pelos dois métodos de ligação – DirLipNeut e PosInsLipNeut – com tamanhos finais diferentes. As formulações foram extrusadas sequencialmente até um filtro com 100 nm ou 50 nm de diâmetro de poro, avaliando-se se havia diferenças na quantidade de péptido ligado aos lipossomas.

Tabela IV.4 – Efeito do diâmetro dos lipossomas com lípidos neutros no rendimento da ligação de antagonista G. Os valores correspondem a uma experiência representativa para o diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (D_H) e percentagem molar de antagonista G em relação ao lípido total dos lipossomas extrusados por um filtro de 100 nm e 50 nm de diâmetro de poro.

Lipossomas	Diâmetro do filtro final	D_H (μm)	Antagonista G/Lípido (% mol)
DirLipNeut	100 nm	0,15	0,24
	50 nm	0,13	0,37
PosInsLipNeut	100 nm	0,15	0,15
	50 nm	0,12	0,27

Composição dos DirLipNeut e PosInsLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida na razão molar (68,25:30,5:0,55:0,70)

^a medido a pH 6,0

Foi possível observar um maior rendimento de associação do antagonista G aos lipossomas com tamanho inferior analisando a percentagem molar obtida relativamente ao lípido total (Tabela IV.4). Apesar de só se ter realizado uma experiência, dado que os valores obtidos foram os espectáveis por comparação com outros exemplos realizados no laboratório, selecionou-se para experiências futuras as formulações lipossomais com lípidos neutros extrusadas até um filtro de 50 nm de diâmetro de poro. Esta diferença no rendimento da ligação do antagonista G pode ser explicada pelo aumento da área superficial com a diminuição do tamanho, ou seja, se a área superficial dos lipossomas – local onde ocorre a ligação covalente do hexapéptido – aumenta, isso traduz-se no aparecimento de mais espaço à superfície dos lipossomas onde o antagonista G se pode ligar ou os lípidos micelares se podem inserir.

3.1.3. Estudo do tempo de incubação no método de pós-inserção

Como o sucesso do método de pós-inserção depende da extensão da inserção dos lípidos que constituem as micelas nos lipossomas, um dos parâmetros que se estudou para otimizar a quantidade de péptido ligado aos PosInsLipNeut foi o tempo de incubação dos lipossomas com as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-antagonista G, para perceber se quanto maior o tempo de incubação, maior era a inserção dos lípidos micelares, o que se iria traduzir numa maior quantidade de antagonista G nos lipossomas.

Para isso, quantificou-se o antagonista G em formulações lipossomais após 1 h e 18 h de incubação dos lipossomas com as micelas (Tabela IV.5). É de referir que só é possível ocorrer a inserção de outros lípidos, como o DSPE, na bicamada lipossomal porque esta se encontrava na sua fase fluida-ordenada mesmo à temperatura ambiente pois, caso contrário, tinha que se fornecer energia, por exemplo sob a forma de calor, tal como acontece na formulação com lípidos catiónicos.

Tabela IV.5 – Efeito do tempo de incubação na incorporação dos lípidos micelares contendo antagonista G em PosInsLipNeut. Os valores foram obtidos numa experiência representativa para a percentagem molar de antagonista G em relação ao lípido total dos lipossomas após uma incubação dos lipossomas com as micelas de 1 h e 18 h.

Tempo de incubação	[Antagonista G] (mM)	[Lípido] (mM)	Antagonista G/Lípido (% mol)
1 h	0,01	13,3	0,15
18 h	0,01	12,3	0,14

Pela análise dos resultados obtidos na Tabela IV.5 pode concluir-se que um período de incubação de 1 h dos lipossomas com as micelas de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida-antagonista G é suficiente para que haja a inserção dos lípidos micelares, uma vez que o aumento do tempo de incubação origina uma quantidade de antagonista G ligado aos lipossomas semelhante à obtida ao fim de 1 h. Assim, nos estudos subsequentes, durante a preparação de PosInsLipNeut, a incubação dos lipossomas com as micelas passou a ser feita somente durante 1 h.

3.2. Caracterização das formulações lipossomais com lípidos neutros direcionadas com antagonista G (DirLipNeut e PosInsLipNeut)

A ligação do antagonista G ativado com um grupo sulfidrílo (antagonista G-SH) foi feita através da adição deste péptido a uma formulação lipossomal com lípidos neutros contendo na sua composição o lípido DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida. A proporção de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida utilizada (0,7 % mol) teve como base a otimização feita por Corvo e colegas⁹⁷ para o acoplamento de superóxido dismutase em lipossomas com a mesma composição lipídica.

Para a ligação do antagonista G ativado aos lipossomas recorreu-se a dois métodos: método de ligação direto e de pós-inserção, comparando-se a eficácia de ligação obtida em ambos.

Os DirLipNeut e PosInsLipNeut foram caracterizados relativamente ao seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, quantidade de lípido e quantidade de antagonista G. Estes fatores foram comparados com os obtidos nos NDLipNeut que serviram como controlo, de forma a perceber se o facto de se ligar um composto à superfície dos lipossomas com longo tempo de circulação afeta as suas propriedades (Tabela IV.6). Como na extrusão dos lipossomas com lípidos neutros direcionados se incluiu a passagem pelo filtro com 50 nm de diâmetro de poro, os NDLipNeut foram novamente caracterizados, pois na Tabela IV.1 a extrusão tinha parado no filtro com 100 nm de diâmetro de poro.

Tabela IV.6 – Caracterização global das formulações com lípidos neutros não direcionadas e direcionadas preparadas pelo método de ligação direto ou de pós-inserção. Os valores indicados são as médias \pm desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos 3 experiências independentes ($n \geq 3$).

Lipossomas	NDLipNeut	DirLipNeut	PosInsLipNeut
Diâmetro hidrodinâmico (μm)	$0,11 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
Índice de polidispersão	$0,080 \pm 0,011$	$0,081 \pm 0,007$	$0,084 \pm 0,007$
Potencial Zeta (mV)^a	$-1,99 \pm 0,54$	$-2,24 \pm 0,32$	$-2,32 \pm 0,48$
[Lípido] (mM)	$15,3 \pm 1,1$	$15,5 \pm 1,3$	$13,9 \pm 1,7$
Rendimento lipídico (%)	$84,3 \pm 5,5$	$83,2 \pm 7,2$	$78,3 \pm 14,2$
Antagonista G/Lípido (% mol)	-	$0,53 \pm 0,12$	$0,27 \pm 0,01$
Antagonista G/Maleimida (% mol)	-	$75,3 \pm 17,3$	$39,0 \pm 0,4$
Capacidade de inserção (g/mol de antagonista G por lípido)	-	$5,1 \pm 1,1$	$2,6 \pm 0,1$

Composição dos lipossomas (Razão molar):

-NDLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ (68,25:30,5:1,25)

-DirLipNeut e PosInsLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (68,25:30,5:0,55:0,70)

^a medido a pH 6,0

Pela análise dos resultados obtidos, observa-se que não existem alterações a nível do tamanho médio e da homogeneidade da população de lipossomas. Estes resultados estão de acordo com o esperado uma vez que, apesar dos lipossomas direcionados terem um ligando adicional à superfície, este é um péptido pequeno, não sendo capaz de causar alterações significativas relativamente ao tamanho das partículas. Como o antagonista G é uma molécula neutra, não eram também expectáveis alterações no potencial zeta, tal como é confirmado pelos valores obtidos pois mantêm-se dentro do intervalo de ± 4 mV, considerando-se que a neutralidade é mantida em ambas as formulações lipossomais direcionadas. Desta forma, pode-se dizer que os dois métodos de ligação do antagonista G utilizados não interferem com a membrana lipossomal, uma vez que os resultados obtidos são semelhantes aos dos lipossomas não direcionados.

Relativamente ao rendimento lipídico obtido para as formulações, observou-se um ligeiro decréscimo no método de pós-inserção. Ora como este método tem mais passos, nomeadamente preparar micelas onde a massa de lípido pesada é bastante baixa (1 – 2 μ g) e há transferência de uns recipientes para os outros, podem existir mais perdas de lípidos, o que originaria não só um rendimento lipídico mais baixo como também mais variável, tal como foi observado na Tabela IV.6.

Como um dos principais objetivos deste estudo consistiu na avaliação da eficiência de ligação do péptido aos lipossomas nos dois métodos, um dos parâmetros mais importantes é a razão molar obtida entre antagonista G e lípido total, tendo esta sido ligeiramente inferior no método da pós-inserção. Este facto pode dever-se à possibilidade de haver mais perdas de lípido neste método, principalmente na parte do procedimento que diz respeito às micelas, o que pode diminuir a quantidade de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida disponível para ligar o antagonista G ativado. Para além disso, há que ter em consideração que o processo de inserção não tem um rendimento de 100 %, mesmo estando a membrana lipossomal na sua fase fluida-ordenada – que favorece a inserção de lípidos –, visto que a inserção resulta de um equilíbrio entre o lípido inserido na membrana e o que está nas micelas.

Devido a estes fatores, é plausível que, no final, os lipossomas preparados pelo método de pós-inserção tenham menor quantidade de antagonista G ligado. O mesmo tipo de relação entre os dois métodos foi observado em estudos prévios por Holovanchuk¹⁰¹, tendo-se obtido valores bastante similares, quer a nível da razão molar entre antagonista G e lípido, como da razão molar entre antagonista G e maleimida, o que demonstra a reprodutibilidade dos métodos utilizados.

Há que ter em conta que, ao ser adicionado DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida às formulações, a sua orientação é aleatória não ficando sempre o grupo funcional para o exterior dos lipossomas. Assim, a eficiência de 75 % obtida para a ligação do antagonista G à maleimida (dada pela razão molar péptido/maleimida) usando o método direto é bastante elevada, indicando que o péptido se deve ter ligado à maioria dos grupos maleimida disponíveis, sendo, portanto, este método de ligação bastante eficiente. No caso do método de pós-inserção, como já foi previamente referido, nem todos os lípidos das micelas conseguem ser inseridos nos lipossomas. O facto de se ter obtido um rendimento de ligação de 40 % significa que também deve ter ocorrido a ligação do antagonista G a grande parte dos grupos maleimida, apesar de nem todos terem sido inseridos nos lipossomas.

Assim, apesar de ambos os métodos de ligação do antagonista G permitirem a obtenção de DirLipNeut e PosInsLipNeut passíveis de ser utilizados em ensaios *in vitro* e *in vivo*, o método direto de ligação apresentou vantagens a nível da quantidade de antagonista G ligado (5,1 vs. 2,6 g/mol de antagonista G por lípido) sendo, portanto, este o método considerado mais eficaz para a preparação das formulações lipossomais com lípidos neutros.

Estes três parâmetros, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta, foram medidos em lipossomas preparados por outro colega – Holovanchuk¹⁰¹ – há dois anos (mas cuja extrusão parou num filtro de 100 nm de poro) e posteriormente guardados, tendo sido comparados com os valores obtidos imediatamente após a sua preparação, de modo a perceber se as preparações lipossomais são estáveis – condição crucial para uma possível aplicação clínica. Observou-se que a sua estabilidade se mantém ao fim desse tempo (Tabela IV.7).

Tabela IV.7 – Estabilidade dos lipossomas com lípidos neutros. Comparação dos valores obtidos para o diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) de lipossomas com lípidos neutros sem e com direccionamento preparados pelo método direto e de pós-inserção imediatamente após serem preparados e após 2 anos da sua preparação.

Altura da caracterização	Lipossomas	D_H (μm)	PDI	ζ (mV) ^a
Imediatamente após preparação (24/06/2014)	NDLipNeut	0,14	0,063	-1,50
	DirLipNeut	0,15	0,090	-0,85
	PosInsLipNeut	0,14	0,060	-1,38
Após 2 anos da preparação	NDLipNeut	0,13	0,071	-2,01
	DirLipNeut	0,15	0,054	-4,02
	PosInsLipNeut	0,15	0,080	-2,89

Composição dos lipossomas (Razão molar):

-NDLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ (68,25:30,5:1,25)

-DirLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (68,25:30,5:0,55:0,70)

-PosInsLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (68,25:30,5:0,55:0,70)

^a medido a pH 6,0

3.3. Formulação lipossomal com lípidos catiónicos direccionada com antagonista G (PosInsLipCat)

O protocolo de preparação dos LipCat não sofreu nenhuma otimização neste estudo pois já tinha sido alvo de otimização em trabalhos anteriores^{83,100}. Como foi visto que para esta formulação o método de pós-inserção permitia a obtenção de lipossomas com maior quantidade de antagonista G ligado, só se utilizou este método para preparar as formulações lipossomais com lípidos catiónicos direccionadas, uma vez que, como um dos objetivos deste estudo é analisar a internalização dos lipossomas, convém que haja ligando em quantidade suficiente para ser reconhecido pelos recetores à superfície das células. Para além disso, no caso de se querer utilizar estes lipossomas como sistema de transporte de compostos com carga negativa, como material genético, no seu interior, foi com este método que se obteve uma eficiência de encapsulação mais elevada¹⁰⁰. Tal como para os lipossomas com lípidos neutros, fez-se um resumo das características principais dos PosInsLipCat para perceber se o facto de haver um péptido à superfície dos lipossomas com longo tempo de circulação afeta as propriedades destes (Tabela IV.8).

Tabela IV.8 - Caracterização global das formulações com lípidos catiónicos direcionadas preparadas pelo método de pós-inserção de ligação do antagonista G aos lipossomas. Os valores indicados são as médias \pm desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos 3 experiências independentes ($n \geq 3$).

Lipossomas	PosInsLipCat
Diâmetro hidrodinâmico (μm)	$0,10 \pm 0,01$
Índice de polidispersão	$0,113 \pm 0,031$
Potencial Zeta (mV)^a	$-1,86 \pm 0,41$
[Lípido] (mM)	$6,1 \pm 1,0$
Antagonista G/Lípido (% mol)	$0,86 \pm 0,06$
Antagonista G/Maleimida (% mol)	$56,9 \pm 18,9$
Capacidade de inserção (g/mol de antagonista G por lípido)	$8,2 \pm 0,6$

Composição dos PosInsLipCat – DSPC:Chol:DODAP:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida na razão molar (20:45:25:8:2)

^a medido a pH 6,0

Pela análise dos resultados obtidos, observou-se que, mais uma vez, a ligação do antagonista G à superfície dos lipossomas não interferiu com as suas propriedades visto que não foram detetadas alterações a nível do seu tamanho médio, na homogeneidade da distribuição dos seus tamanhos e no potencial zeta ao comparar com os valores obtidos na Tabela IV.3.

Já na concentração lipídica final dos lipossomas foi perceptível o mesmo efeito que o existente nos PosInsLipNeut, ou seja, houve uma diminuição na quantidade de lípido nas formulações preparadas pelo método de pós-inserção relativamente aos lipossomas não direcionados, possivelmente devido à maior probabilidade de perdas de lípido nas micelas. Neste caso, a diferença dos valores de concentração lipídica foi maior, mas isso pode dever-se em parte ao facto de, nesta formulação, a razão molar de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida utilizada nas micelas ter sido superior à dos PosInsLipNeut (2 vs. 0,7 % mol em relação ao lípido total). Como a preparação destes lipossomas incluía um passo onde 40 % do volume onde se encontram consistia em etanol e houve passos que foram realizados a 65 °C, parte do etanol evaporou-se, o que causou uma variação de volume distinta em cada preparação, não sendo possível calcular o rendimento lipídico total do processo. Apesar disso, é de relembrar que esta formulação foi feita partindo de uma concentração lipídica de 13 mM em vez de 20 mM, não se devendo a menor concentração lipídica final obtida nos PosInsLipCat a rendimentos muito baixos face aos obtidos nos lipossomas com lípidos neutros.

Relativamente à eficiência de ligação do péptido aos lipossomas, na Tabela IV.8 a razão molar obtida entre antagonista G e lípido total aparentou ser superior à dos lipossomas com lípidos neutros. Contudo, como a razão molar utilizada de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida foi de 2 % mol em vez dos 0,7 % mol dos PosInsLipNeut, a análise deve ser feita através da razão molar obtida entre antagonista G e maleimida. Assim, pode-se concluir que a ligação ocorreu com uma eficiência dentro da mesma gama de valores que a dos lipossomas com lípidos neutros. Comparando com os resultados obtidos por Moreira e colegas⁸³ na preparação de lipossomas pelo mesmo método, a eficiência de ligação obtida é bastante semelhante (57 % vs. 60 % mol antagonista G/maleimida). No entanto, como se estão a incluir apenas os lípidos que foram inseridos nos lipossomas – e não a eficácia de ligação nas micelas, como considerado por Moreira e colegas –, parece ter-se obtido uma melhor eficácia na ligação do antagonista. Fica a ressalva de que o desvio padrão obtido para a razão molar entre antagonista G e maleimida foi grande. De forma a esclarecer melhor se a eficácia deste método realmente melhorou relativamente à obtida noutros estudos, foi calculada a capacidade de inserção, que relaciona a quantidade de antagonista G existente por mol de lípido, tendo-se concluído que os valores

obtidos neste estudo foram efetivamente um pouco superiores aos encontrados na literatura¹⁰⁰ para lipossomas com uma composição lipídica muito semelhante (8,2 vs. 6,4^a g/mol de antagonista G por lípido).

Este método permite então preparar PosInsLipCat adequados para serem utilizados em ensaios *in vitro* e *in vivo*, tendo permitido a obtenção de uma quantidade maior de antagonista G ligado do que nas formulações lipossomais com lípidos neutros direcionadas, o que está em concordância com o facto de a sua formulação possuir maior percentagem de DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida.

4. Internalização de lipossomas de longo tempo de circulação na linha celular H69

Após a obtenção das formulações lipossomais, quer com lípidos neutros como catiónicos, com e sem direcionamento e sua caracterização, prosseguiu-se para os estudos de internalização celular dos lipossomas.

Nestes estudos de internalização, os resultados foram analisados de duas formas distintas: qualitativamente, recorrendo à técnica de microscopia de fluorescência (e contraste de fase, para perceber a localização das células quando estas não são fixadas), e quantitativamente através da citometria de fluxo com focalização acústica.

Para este tipo de estudos todas as formulações lipossomais tiveram que incluir Rhod (Tabela IV.9), de modo a que através da sua marcação fluorescente fosse possível analisar a sua presença no interior das células H69 – linha celular usada como modelo de SCLC.

Devido à presença de rodamina B não foi possível fazer a quantificação de antagonista G ligado aos lipossomas, visto que este fluoróforo interfere com a fluorescência do antagonista G. Assim, assumiu-se que a quantidade de péptido ligado era semelhante à obtida em formulações sem rodamina B, pois já foi visto em estudos anteriores e, atendendo que a quantidade adicionada é quase residual, a presença de rodamina B não interfere com a ligação do antagonista G. Quanto aos restantes parâmetros, estes foram comparados entre formulações com e sem marcação, tendo sido obtidos resultados semelhantes. Adicionalmente mediu-se a emissão de fluorescência da rodamina B em amostras das diversas formulações lipossomais com a mesma concentração lipídica (10mM), de modo a perceber se as diferenças de fluorescência se devem só à quantidade de lipossomas que é internalizada pelas células H69 ou se depende também da quantidade de marcação que cada formulação possui.

^a Valor de I.C. da literatura foi multiplicado por 2, pois a razão péptido/lípido foi 1/100 em vez de 2/100 como utilizado no presente estudo.

Tabela IV.9 – Intensidade de fluorescência da rodamina B obtida para lipossomas, com lípidos neutros ou catiónicos, não direcionados e direcionados, marcados com Rhod. Os valores indicados são as médias \pm desvio padrão dos resultados obtidos em duas experiências independentes (n=2).

[Lípido] (mM)	Lipossomas	Intensidade fluorescência da rodamina B (u.a.)
10	RhodNDLipNeut	5594 \pm 31
	RhodDirLipNeut	5116 \pm 190
	RhodPosInsLipNeut	5238 \pm 571
	RhodNDLipCat	4372 \pm 33
	RhodPosInsLipCat	3881 \pm 219

Composição dos lipossomas (Razão molar):

- RhodNDLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:Rhod (68,25:30,5:1,25:0,25)
- RhodDirLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida:Rhod (68,25:30,5:0,55:0,7:0,25)
- RhodPosInsLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida:Rhod (68,25:30,5:0,55:0,7:0,25)
- RhodNDLipCat – DSPC:Chol:DODAP:DSPE-PEG₂₀₀₀:Rhod (20:45:25:8:0,25)
- RhodPosInsLipCat – DSPC:Chol:DODAP:DSPE-PEG₂₀₀₀: DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida:Rhod (20:45:25:8:2:0,25)

Dos resultados obtidos para a fluorescência emitida pelas diversas formulações, observou-se emissão de níveis de fluorescência semelhantes para o mesmo tipo de formulação, ou seja, nas formulações com lípidos neutros a intensidade de fluorescência obtida foi semelhante e nas com lípidos catiónicos também. Entre os dois tipos de formulação é que os resultados estão mais afastados, provavelmente devido aos métodos de preparação serem tão distintos. Apesar disto, foi possível fazer na mesma uma análise dos resultados obtidos para a internalização nas células, podendo ter-se em conta nos dados quantitativos as diferenças observadas na fluorescência da rodamina B se se quiser uma análise mais pormenorizada dos resultados.

As características obtidas para as formulações utilizadas nos ensaios *in vitro* estão apresentados na Tabela IV.10 e os seus valores estão em concordância com os obtidos na caracterização global das formulações apresentada anteriormente (Tabela IV.3, Tabela IV.6 e Tabela IV.8).

Tabela IV.10 - Caracterização global das formulações, com lípidos neutros ou catiónicos, não direcionadas e direcionadas preparadas pelo método de ligação direto ou de pós-inserção utilizados nas experiências *in vitro*. Os intervalos de valores indicados correspondem aos resultados obtidos em pelo menos duas experiências independentes ($n \geq 2$).

Tipo de lipossomas	Não direcionados	Direcionados Método direto	Direcionados Método pós-inserção
<u>Lipossomas com lípidos neutros:</u>			
Diâmetro hidrodinâmico (μm)	0,11 – 0,12	0,12	0,12
Índice de polidispersão	0,087 – 0,089	0,077 – 0,081	0,072 – 0,088
Potencial Zeta (mV) ^a	-1,32 – -1,50	-2,28 – -2,62	-2,09 – -2,65
[Lípido] (mM)	13,9 – 15,3	15,1 – 15,8	12,1 – 12,4
<u>Lipossomas com lípidos catiónicos:</u>			
Diâmetro hidrodinâmico (μm)	0,09		0,09
Índice de polidispersão	0,057 – 0,167		0,066 – 0,118
Potencial Zeta (mV) ^a	-1,53 – -1,83		-1,45 – -2,27
[Lípido] (mM)	9,6 – 10,5		5,9 – 6,1

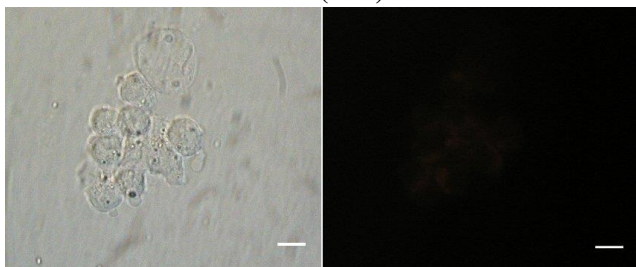
Composição dos lipossomas (Razão molar):

- NDLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀ (68,25:30,5:1,25)
- DirLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (68,25:30,5:0,55:0,7)
- PosInsLipNeut – EPC:Chol:DSPE-PEG₂₀₀₀:DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (68,25:30,5:0,55:0,7)
- NDLipCat – DSPC:Chol:DODAP:DSPE-PEG₂₀₀₀ (20:45:25:8)
- PosInsLipCat – DSPC:Chol:DODAP:DSPE-PEG₂₀₀₀: DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimida (20:45:25:8:2)

4.1. Microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência em células não fixadas

Como a linha celular H69 cresce em suspensão, optou-se por fazer alguns ensaios de internalização com células não fixadas, pois estes permitem ter uma melhor percepção do que ocorre nas células quando estas estão vivas, apesar de dificultar a obtenção de imagens devido ao volume que as células possuem, fazendo com que muitas vezes haja vários planos e o que dificulta a análise das imagens. Assim, após a incubação durante 1 h e 3 h das células H69 com as várias formulações lipossomais e da lavagem dos lipossomas não internalizados, as células foram observadas em contraste de fase, que permite visualizar as células e realçar a sua morfologia, e microscopia de fluorescência, que permite localizar os lipossomas. Ao fazer uma comparação das fotografias obtidas pelas duas técnicas, tal como está apresentado a seguir (Figura IV.4), é possível perceber se há ou não internalização dos lipossomas por parte das células.

Só células (H69) – 3 h



Só lipossomas – 3 h incubação



Células H69 + lipossomas

1 h incubação

3 h incubação

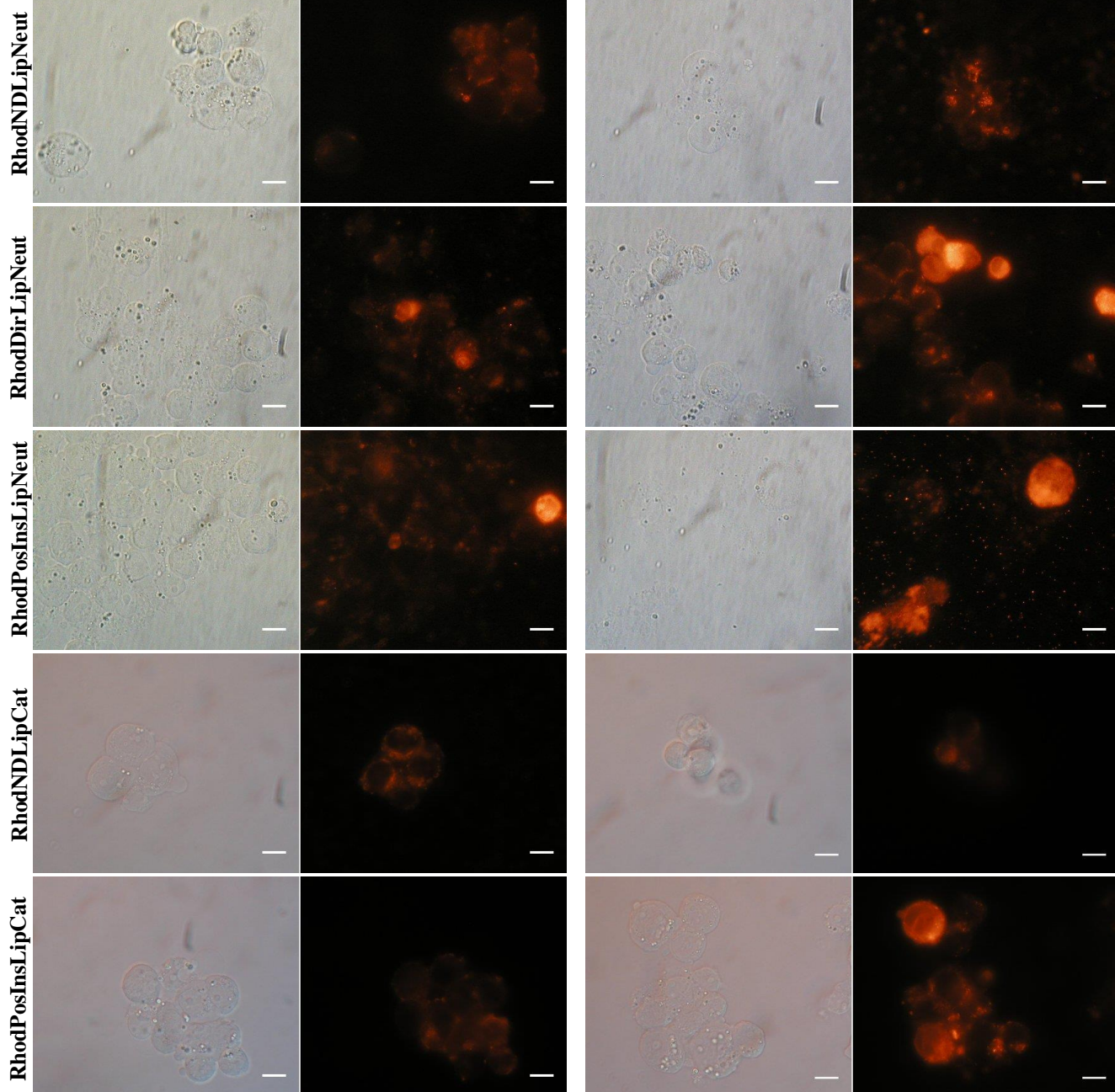


Figura IV.4 - Imagens de contraste de fase (esquerda) e microscopia de fluorescência (direita) das células H69 não fixadas após 1 h e 3 h de incubação com 250 μ M de lipossomas, com lípidos neutros ou catiónicos, não direcionados (RhodNDLipNeut e RhodNDLipCat) ou direcionados com antagonista G (RhodDirLipNeu, RhodPosInsLipNeut e RhodPosInsLipCat, consoante se tenha usado o método direto ou o de pós-inserção), marcados com rodamina B (vermelho). Barra branca – 10 μ m. Para tirar as fotografias recorreu-se à objetiva de ampliação 60 x e às seguintes condições: para o contraste de fase utilizou-se uma abertura da lente de 2,8 e um tempo de exposição de 1/6 s, para a microscopia de fluorescência da rodamina B utilizou-se uma abertura de 3,2 e um tempo de exposição de 1/5 s.

Os controlos realizados, ou seja, o caso onde ou só existem lipossomas ou quando só há células, servem para demonstrar que a fluorescência que se observa nas restantes condições se deve realmente só aos lipossomas que foram internalizados pelas células, visto que quando só existem células a sua autofluorescência no filtro da rodamina B é quase inexistente e quando só há lipossomas estes são totalmente eliminados no processo de lavagem.

Assim, partindo do pressuposto que a fluorescência visível só está relacionada com a ligação dos lipossomas marcados com rodamina B aos recetores celulares e a sua possível internalização, pode dizer-se que houve uma menor ligação e internalização de lipossomas pelas células no caso dos lipossomas não direcionados (NDLipNeut e NDLipCat), visto que a intensidade de fluorescência vermelha conferida pelo fluoróforo é menor, quando comparado com os lipossomas direcionados.

Já no caso das formulações direcionadas, apesar de ser visível uma maior fluorescência o que indica que, de facto, o direcionamento dos sistemas lipossomais conduziu a uma maior ligação destes aos recetores celulares e, possivelmente, a uma maior internalização destes, a sua distribuição nas células não foi homogênea. Isto pode estar relacionado ou com o facto de nem todas as células expressarem a mesma quantidade de recetores que reconhecem o agente de direcionamento ou com o facto de as células crescerem em agregados, o que faz com que o acesso das células que ficam na parte mais interna do agregado aos lipossomas seja menor, diminuindo então a quantidade de lipossomas internalizados por essas células. De forma a tentar minimizar os efeitos deste último fator, as células foram desagregadas antes de se iniciar a experiência. Contudo, estas não ficam individualizadas, só se observando uma diminuição substancial do tamanho dos agregados, e, portanto, poderá haver, na mesma, interferências devido a existência destes agregados.

A intensidade de fluorescência da rodamina B observada nas células H69 incubadas com formulações direcionadas é maior após o período de incubação de 3 h, o que está em concordância com o aumento da associação celular (composta pela ligação dos lipossomas à superfície das células e posterior internalização) que, de acordo com o observado por Moreira e colegas⁸², ocorre ao longo de 4 h. Este aumento com o tempo de incubação pode dever-se a um aumento da endocitose mediada pelos recetores que são reconhecidos pelo antagonista G. Com efeito, será de esperar que haja um aumento da endocitose até se atingir a saturação dos recetores, ponto em que a endocitose mediada em vez de aumentar, deverá manter-se aproximadamente constante devido à reciclagem dos recetores que, após serem transportados de volta para a superfície da célula, terão novamente a capacidade de reconhecer e ligar-se a mais ligandos, internalizando-os. Pelo contrário, ao comparar-se os resultados obtidos ao fim de 1 h e 3 h nas formulações não direcionadas, não se observaram diferenças de intensidade de fluorescência nas imagens. Isto pode dever-se ao facto de as vias de endocitose não específicas ativas nas células H69 já estarem saturadas ao fim de 1 h de incubação, daí que os níveis de marcação com rodamina nas células incubadas com formulações não direcionadas se mantenham semelhantes ao fim dos dois períodos de incubação.

4.2. Microscopia de fluorescência em células fixadas

Fizeram-se ainda outros ensaios de internalização com células H69, que, no final, foram fixadas, na tentativa de se conseguirem obter imagens com maior qualidade visto que, como as células aderem à lamela, deixa de haver a interferência das diferentes camadas de líquido. Para além disso, há a possibilidade de se fazer a marcação da região do núcleo das células com fluorescência, podendo-se sobrepor essa fluorescência com a dos lipossomas tornando mais fácil a análise das imagens e possibilitando a identificação do local da célula onde os lipossomas se localizam preferencialmente.

Assim, após a incubação durante 1 h e 3 h das células H69 com as várias formulações lipossomais e da lavagem dos lipossomas não internalizados, as células foram fixadas com PFA e coradas com DAPI, sendo posteriormente observadas com microscopia de fluorescência, que permite localizar tanto as células (núcleos) como os lipossomas. Ao fazer a sobreposição das fotografias obtidas nos dois tipos de fluorescência é então possível perceber se há ou não internalização dos lipossomas por parte das células H69.

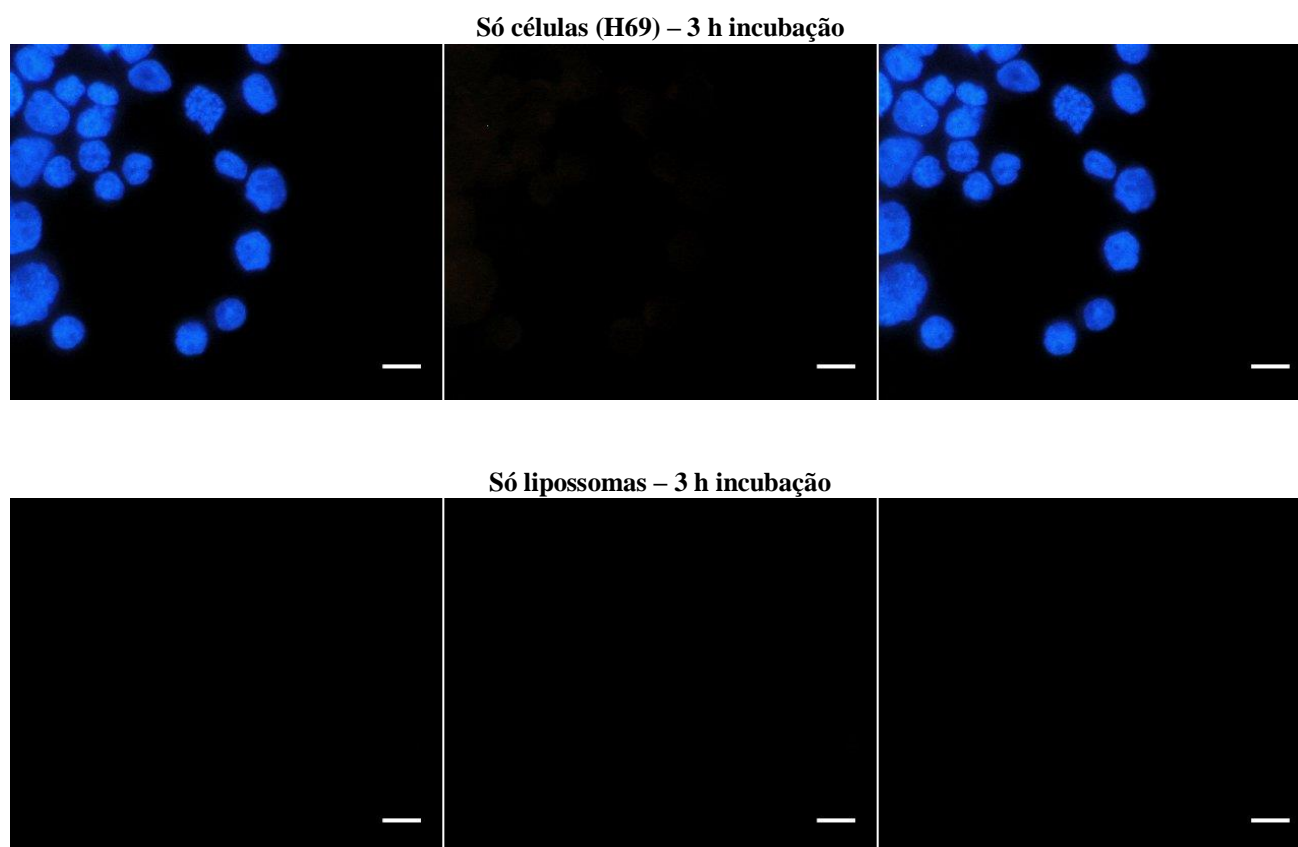
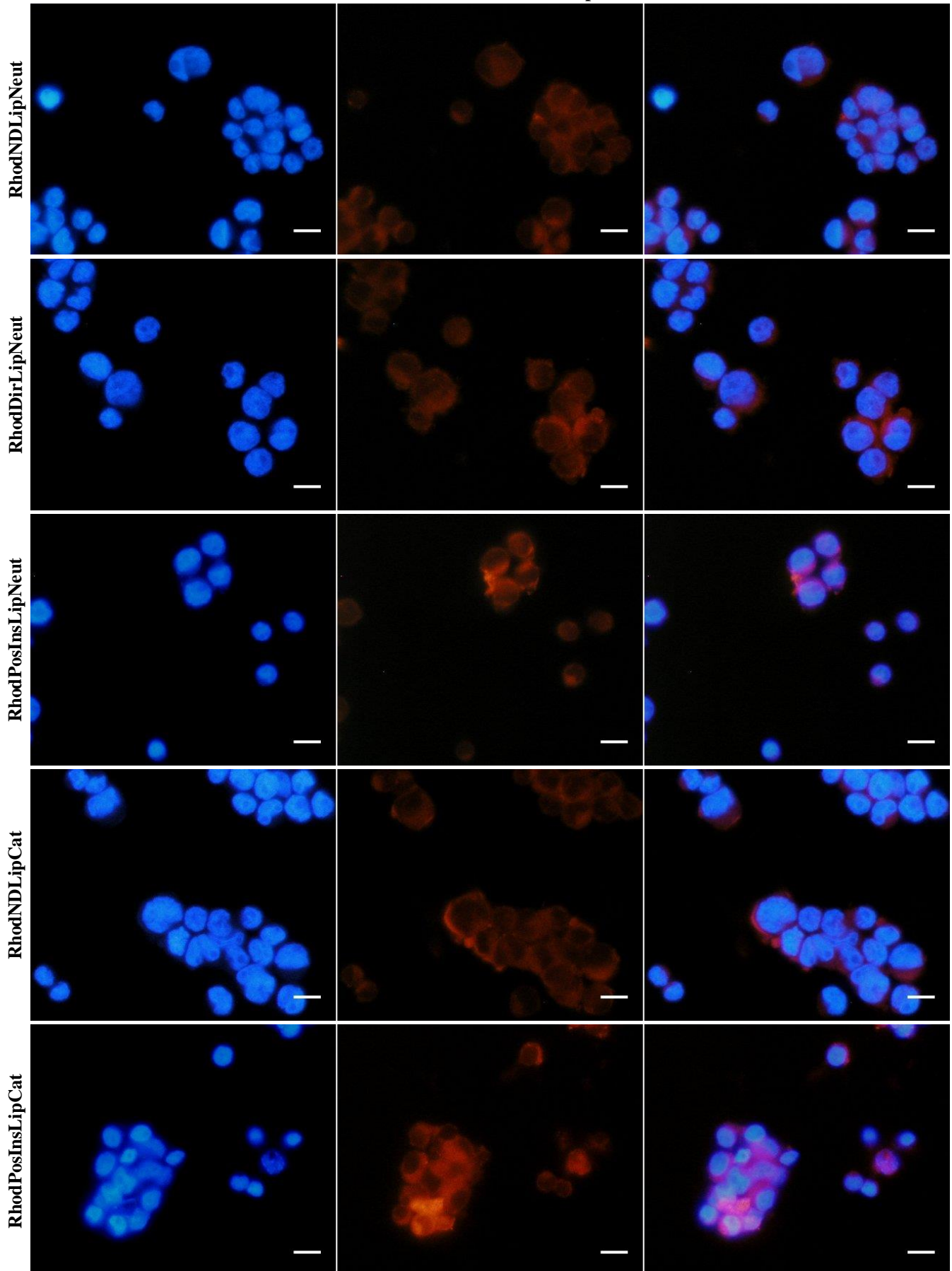


Figura IV.5 – Imagens de microscopia de fluorescência dos controlos negativos: células H69 fixadas e coradas com DAPI (azul) após 3 h de incubação sem terem sido adicionados lipossomas ou lipossomas marcados com rodamina B (vermelho) incubados sem células. As imagens foram obtidas separadamente com filtros para o DAPI (esquerda) e para a rodamina B (meio), tendo sido posteriormente sobrepostas (direita) com recurso ao *software ImageJ Fiji (NIH, EUS)*. Barra branca – 10 μ m. Para tirar as fotografias recorreu-se novamente à objetiva de ampliação 60 x e as condições usadas para a microscopia de fluorescência da rodamina B foram iguais às das células não fixadas (abertura da lente de 3,2 e tempo de exposição de 1/5 s). Para a fluorescência do DAPI a abertura da lente foi 3,2 e o tempo de exposição 1/400 s.

Células H69 incubadas 1 h com lipossomas



Células H69 incubadas 3 h com lipossomas

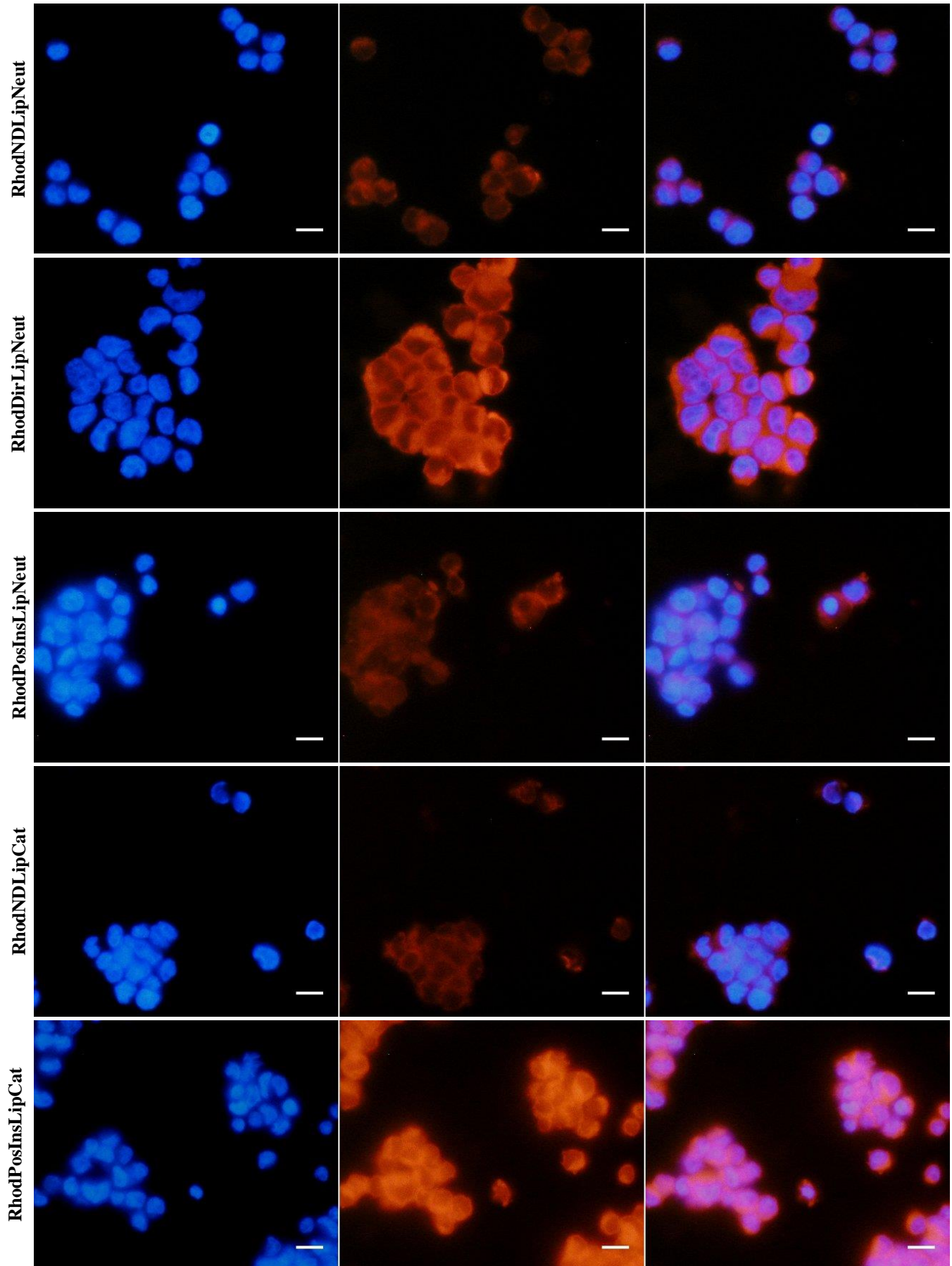


Figura IV.6 – Imagens de microscopia de fluorescência das células H69 fixadas e coradas com DAPI (azul) após 1 h e 3 h de incubação com 250 μ M de lipossomas com lípidos neutros ou catiónicos, não direcionados (RhodNDLipNeut, RhodNDLipCat) ou direcionados com antagonista G (RhodDirLipNeut, RhodPosInsLipNeut e RhodPosInsLipCat, consoante se tenha usado o método direto ou o de pós-inserção), marcados com rodamina B (vermelho). As imagens foram obtidas separadamente com filtros para o DAPI (esquerda) e para a rodamina B (meio), tendo sido posteriormente sobrepostas (direita) com recurso ao *software ImageJ Fiji* (NIH, EUS). Barra branca – 10 μ m. Para tirar as fotografias recorreu-se à objetiva de ampliação 60 x e as condições usadas para a microscopia de fluorescência da rodamina B foram iguais às das células não fixadas (abertura da lente de 3,2 e tempo de exposição de 1/5 s). Para a fluorescência do DAPI a abertura da lente foi 3,2 e o tempo de exposição 1/400 s.

Como estas células H69 possuem pouco espaço citoplasmático em torno do núcleo, tendo o aspeto de esferas pequenas, não é possível distinguir a localização intracelular onde a marcação dos lipossomas foi mais evidente, não se podendo tirar conclusões quanto a esse fator. Já em relação à ligação dos lipossomas aos recetores celulares e, possivelmente, à sua internalização, é possível tirar diversas conclusões, sendo uma delas que a autofluorescência das células detetada com filtro da rodamina B é quase nula, o que implica que a fluorescência vermelha visível nas restantes imagens se deve somente aos lipossomas marcados que ligaram aos recetores e que poderão ter sido internalizados pelas células.

Tal como foi observado nas células não fixadas, as formulações sem direcionamento possuem menor nível de fluorescência da rodamina B que as direcionadas, o que indica que o facto de o antagonista G estar covalentemente ligado aos lipossomas lhes confere uma maior capacidade de ligação e possível internalização, devido ao seu reconhecimento pelos recetores sobre-expressos neste tipo de células de SCLC.

Com o aumento do tempo de incubação não foi visível um aumento do nível de marcação das células com rodamina B no caso dos lipossomas não direcionados, o que se pode dever a ter sido atingida a saturação da ligação e internalização não específicas nas células H69, mantendo-se assim semelhante ao longo do tempo.

Já no caso onde se adicionaram formulações lipossomais direcionadas às células, foi evidente o aumento da fluorescência conferida pela rodamina B consoante o tempo de incubação aumenta, o que, tal como no caso das células não fixadas, está de acordo com os resultados obtidos noutros estudos⁸². Neste caso, as diferenças do nível de marcação com rodamina B nas células ao fim de 3 h de incubação com lipossomas direcionados permite dizer, em termos qualitativos, que há uma ligação crescente às células, e possivelmente uma maior e internalização, dos RhodPosInsLipNeut, seguida dos DirLipNeut e, por fim, dos PosInsLipCat. Esta ordem de aumento de marcação das células está em concordância com os resultados obtidos para a quantificação de antagonista G ligado covalentemente aos lipossomas (Tabela IV.6 e Tabela IV.8), o que indica que, possivelmente, as quantidades de antagonista G à superfície dos lipossomas com lípidos neutros, apesar de conferirem direcionamento ao sistema lipossomal, não fazem com que a saturação dos recetores que existem à superfície das células H69 seja atingida, pois caso contrário seriam esperados níveis de marcação mais semelhantes entre os lipossomas direcionados com este péptido.

4.3. Citometria de fluxo em células não fixadas

Após a análise qualitativa da internalização das formulações lipossomais com e sem direcionamento nas células H69, que permitiram perceber que o direcionamento com o antagonista G aumenta a ligação destes aos receptores celulares, e a sua possível internalização devido à endocitose mediada por recetores deste péptido, que se encontram sobre-expressos nestas células, faltava uma análise quantitativa de modo a perceber o verdadeiro efeito conferido pelo direcionamento dos lipossomas. Esta análise foi feita recorrendo à citometria de fluxo com focalização acústica, apresentando-se os resultados de seguida.

Para a citometria de fluxo, como não havia uma otimização prévia da concentração de lipossomas a adicionar às células, foram testadas 3 concentrações diferentes: 750, 1000 e 2000 μM . Selecionaram-se concentrações mais elevadas que as utilizadas na microscopia de fluorescência pois sabia-se que o *laser* de excitação e o filtro de detecção do citómetro não eram tão adequados aos comprimentos de onda de excitação e emissão da rodamina B quanto os do microscópio de fluorescência usado.

De forma a obterem-se os dados no *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*, inicialmente foi necessário definir a população de células de interesse que, neste caso, correspondiam a células individualizadas, criando-se então uma região denominada R1 onde o aparelho procede à caracterização da amostra até obter uma contagem de 10 000 eventos, ou seja, até detetar 10 000 células que pertencem à população de células daquela região de interesse.

A região R1 foi definida recorrendo à quantidade de luz dispersa pela célula em ângulos pequenos (entre $0,5^\circ$ e 5° relativamente à direção do feixe de luz incidente), denominada luz dispersa para a frente (FCS – *forward scattered light*), que permite avaliar o tamanho relativo da célula¹⁰². De forma a distinguir as populações de células que existem na amostra, representou-se dois parâmetros da FCS, nomeadamente a área (FSC-A) e a altura (FSC-H) do pulso (sinal detetado pelo citómetro), visto que através da relação que têm é possível tirar algumas conclusões, como a existência de detritos celulares, células individuais ou agregadas (Figura IV.7).

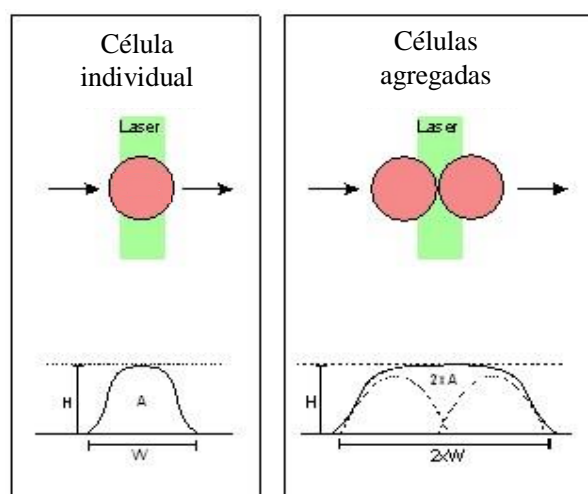


Figura IV.7 – Esquema representativo da forma do pulso detetado pelo citómetro na FCS no caso de haver uma única célula a passar pelo feixe de luz incidente ou duas células ligadas. Citado de ¹⁰³.

Como a desagregação das células H69 realizada em estudos anteriores^{80,81} consistia na passagem das células por agulhas de 21 gauge e 19 gauge, foi esse o procedimento adotado inicialmente. Contudo, ao utilizar no citómetro de fluxo amostras nas quais as células tinham sido desagregadas dessa forma, o número de eventos era muito baixo, não atingindo sequer metade do número mínimo que é usual numa experiência de citometria de fluxo (10 000 eventos). Para além disso, a população de células estava muito deslocada para o canto inferior esquerdo do gráfico apresentado na Figura IV.8, o que indicava que a grande maioria se encontrava fragmentada. Desta forma, teve que se proceder a outra forma de desagregar esta linha celular visto que, na sua passagem pelas agulhas, as células deixavam de ser viáveis.

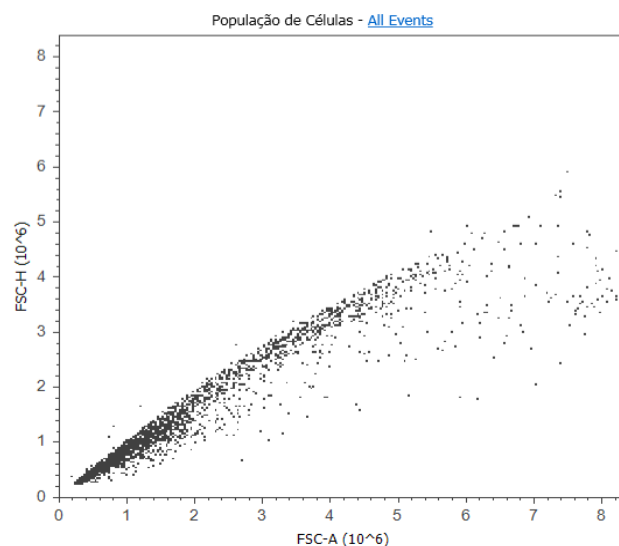


Figura IV.8 - Representação da população de células H69 total detetada pelo citómetro de fluxo. Obtido com o *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*.

Optou-se então por se utilizar TrypLE™, que é normalmente utilizado para libertar linhas celulares aderentes da superfície onde crescem, e que tem a vantagem de não ser tão agressivo para as células como a tripsina, não causando alterações nas proteínas à superfície destas. O procedimento seguido para a desagregação foi o que está descrito na secção dos Materiais e Métodos, tendo-se conseguido obter células H69 individuais viáveis em quantidades adequadas para a realização de experiências, como é visível na Figura IV.9.

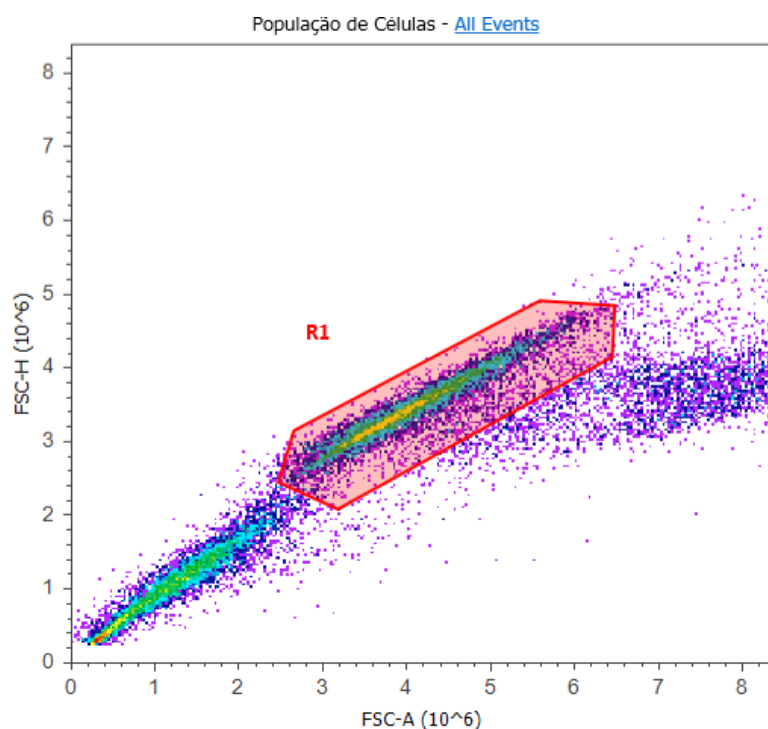


Figura IV.9 – Representação da população de células H69 total detetada pelo citómetro de fluxo com a definição da região de interesse, R1. Obtido com o *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*.

Assim, como apresentado na Figura IV.9, foi definida a região de interesse para a leitura dos eventos R1 de forma a excluir a população do canto inferior esquerdo do gráfico, que diz respeito a detritos celulares e eventuais partículas que tenham ficado na suspensão celular durante a lavagem, visto que apresentam tanto a altura como a área do pulso de FCS mais baixas – o que indica que o que é detetado possui um tamanho menor, causando pouca dispersão –, e a população de células que não estão individuais, como é o caso da população visível no lado direito do gráfico, onde a altura do pulso da FCS se mantém constante mas há o aumento da sua área.

Após a definição da região de interesse, as amostras foram excitadas com um *laser* de 488 nm e mediu-se a intensidade de fluorescência das amostras com o filtro BL2, que deteta a emissão de fluorescência entre os comprimentos de onda de 561 nm e 587 nm, obtendo-se histogramas que mostram o número de células que tinham determinadas intensidades de fluorescência.

De forma a confirmar que os lipossomas que, não só não eram internalizados, como não se ligavam aos recetores, eram eliminados durante as lavagens, analisou-se no citómetro de fluxo o controlo onde só foram colocados lipossomas, obtendo-se os resultados apresentados na Figura IV.10.

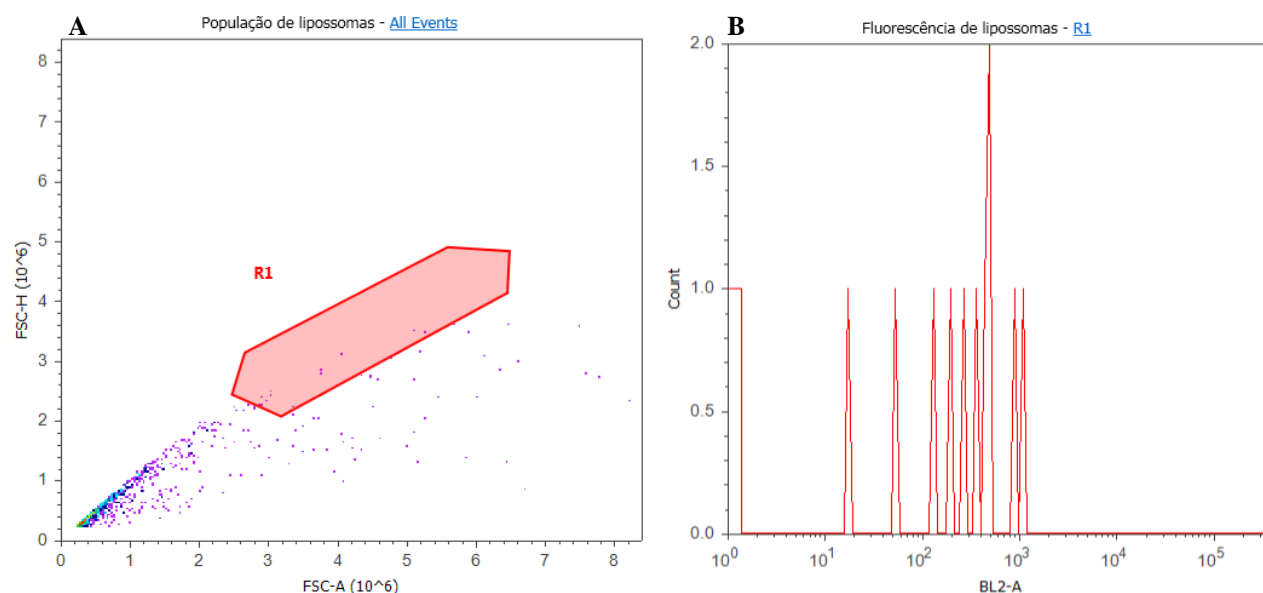


Figura IV.10 – Representação da população de lipossomas detetada pelo citómetro de fluxo com a região R1 definida (A) e número de eventos detetados consoante a intensidade de fluorescência obtida como filtro BL2, na região R1 (B). Obtido com o software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems.

Pela análise da Figura IV.10 é perceptível que na região R1 são detetados muito poucos eventos quando na amostra foram colocados lipossomas mas não havia células, o que indica que estes não vão interferir nos resultados obtidos quando há incubação das formulações lipossomais com células. No gráfico da fluorescência isso é confirmado, pois no máximo foram detetados dois eventos com determinado nível de fluorescência, o que é muito menor que as contagens obtidas nos histogramas das células incubadas com lipossomas. É de referir que, no canto inferior esquerdo do gráfico da população de lipossomas, existe, tal como na Figura IV.9, uma população que deve corresponder a partículas que se tenham depositado na amostra durante o processo de lavagem, visto que os lipossomas não precipitam à velocidade a que ocorrem a centrifugações utilizadas.

De seguida encontra-se representada a intensidade de fluorescência detetada em células que não foram incubadas com lipossomas, em células incubadas com NDLipNeut ou DirLipNeut (Figura IV.11 e Figura IV.12).

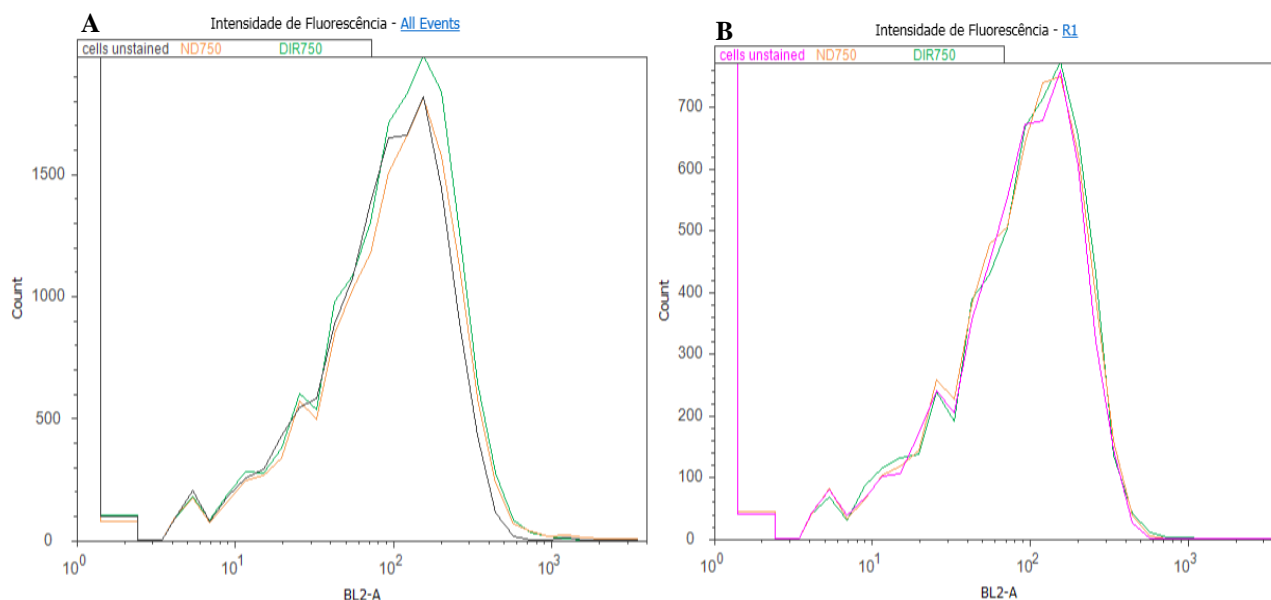


Figura IV.11 – Intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 em células H69 sem lipossomas adicionados (*cells unstained* – preto em A; rosa em B) ou incubadas com 750 μ M de lipossomas com lípidos neutros não direcionados (ND - laranja) ou direcionados preparados pelo método direto (DIR - verde). A fluorescência foi obtida nas populações celulares todas (A) ou só na população celular definida na região R1 (B). Obtido com o *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*.

Pela análise dos gráficos da Figura IV.11, vê-se que o facto de só se analisar a fluorescência na região R1 não causa grandes alterações na intensidade de fluorescência que é detetada visto que o pico se localiza em valores semelhantes do eixo BL2-A, afetando somente o número de células que têm fluorescência, o que tem sentido uma vez que se está a considerar as células todas e não somente uma população. Assim, os gráficos seguintes vão conter só a fluorescência obtida pelo filtro BL2 na região R1.

Pode ainda perceber-se que as células que não foram incubadas com lipossomas apresentavam uma autofluorescência semelhante à fluorescência obtida quando incubadas tanto com lipossomas direcionados como não direcionados a uma concentração de 750 μ M, o que fazia parecer que não havia associação celular dos lipossomas. Uma das razões para que isso ocorresse poderia ser a concentração lipídica utilizada ter sido demasiado baixa. Assim sendo, tentou-se perceber se haveria diferença nos níveis de fluorescência quando as células eram incubadas com diferentes concentrações de lipossomas, quer estes possuissem direcionamento ou não.

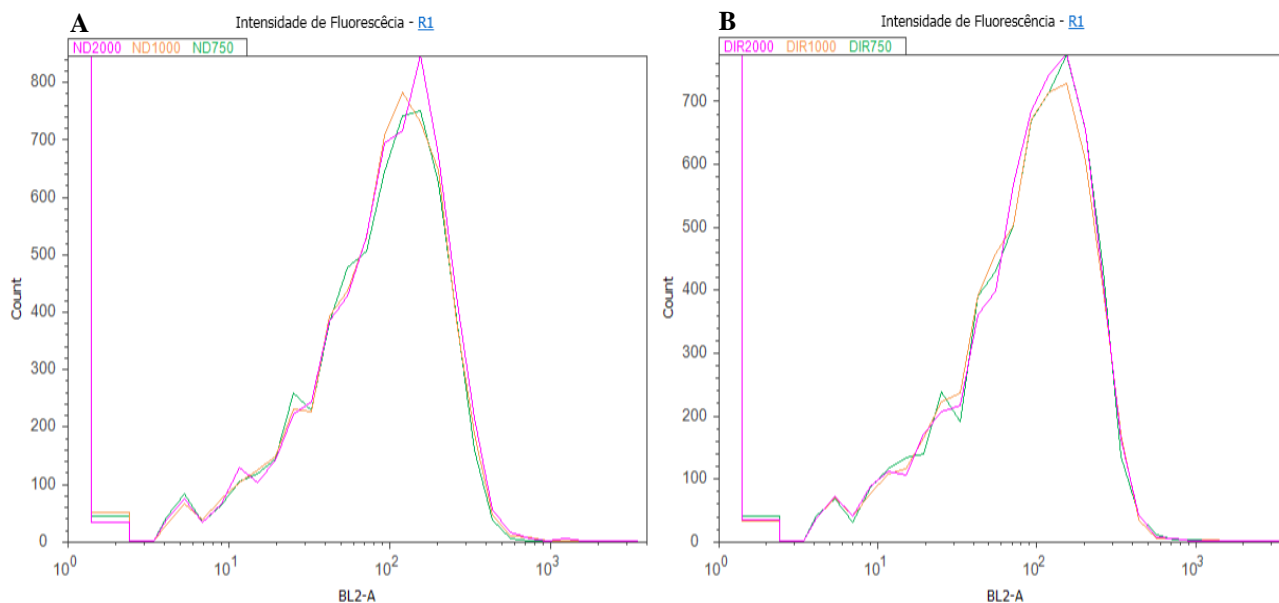


Figura IV.12 – Intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 em células H69 incubadas com 2000 μ M (rosa), 1000 μ M (laranja) ou 750 μ M (verde) de lipossomas com lípidos neutros não direcionados (A) ou direcionados preparados pelo método direto (B) na região R1. Obtido com o software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems.

Da Figura IV.12, é perceptível que a intensidade de fluorescência não tem grandes variações quando a concentração de lipossomas varia, o que implica que a ligação destes às células e possível internalização que ocorre a uma concentração de lipossomas seja semelhante à que existe nas outras, não parecendo ser proporcional à quantidade de lipossomas usados. Ora isto poderia significar que, na menor concentração, já tinha sido atingido o máximo de endocitose não específica, o que implicava que, como a ligação e internalização de nanopartículas lipossomais se mantinha constante, a fluorescência não aumentava. Para além disso, como a intensidade de fluorescência é semelhante para os sistemas lipídicos direcionados e não direcionados, não parecia estar a haver qualquer direcionamento que desencadeasse a ligação aos recetores celulares e a endocitose mediada por recetores. Contudo, tendo em conta que na Figura IV.11 se observou que a fluorescência quando há incubação com a menor concentração de lipossomas era semelhante à autofluorescência das células, esta hipótese de se ter atingido o máximo de endocitose foi excluída, não parecendo haver grandes diferenças na associação celular de lipossomas nas células H69 independentemente da concentração lipídica utilizada na incubação e de haver ou não direcionamento.

Por fim, como se observou previamente que a quantidade de antagonista G ligado covalentemente aos lipossomas variava consoante o método de ligação usado na preparação destes, comparou-se a intensidade de fluorescência dos dois métodos de ligação com a formulação que não tinha direcionamento (Figura IV.13).

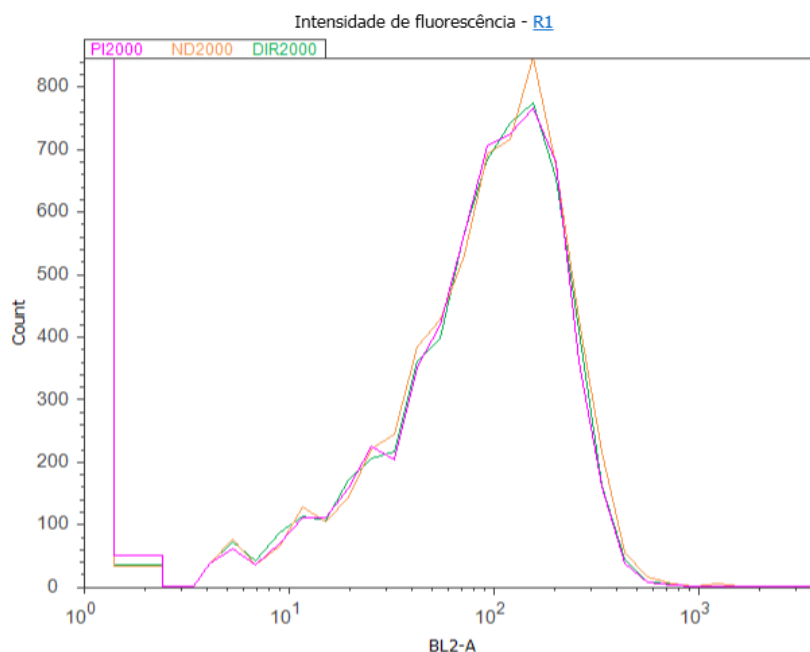


Figura IV.13 – Intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 em células H69 incubadas com 2000 μM de lipossomas com lípidos neutros não direcionados (laranja) ou direcionados preparados pelo método direto (verde) ou de pós-inserção (rosa) na região R1. Obtido com o *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*.

Mais uma vez, a intensidade de fluorescência não apresentou grandes variações independentemente do sistema lipídico incubado com as células, ou seja, aparentemente o antagonista G não está a promover uma maior ligação às células, nem uma maior internalização dos lipossomas.

Esta análise da intensidade da fluorescência através da representação gráfica só foi feita pois, como na microscopia de fluorescência havia diferenças tão evidentes, o mesmo podia ocorrer com a citometria de fluxo. Uma vez que esse não foi o caso, procedeu-se à comparação do valor mediano de intensidade de fluorescência obtido com o *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*.

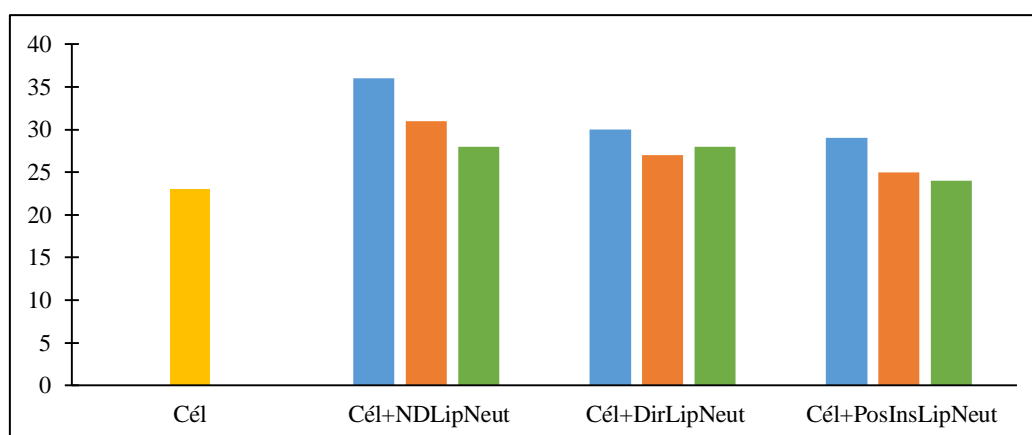


Figura IV.14 – Mediana da intensidade de fluorescência em R1 das células H69 sozinhas ou incubadas com lipossomas marcados com rodamina B. Comparação do valor obtido para a mediana da intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 nas células H69 sozinhas (amarelo) ou incubadas com lipossomas com lípidos neutros não direcionados ou direcionados com antagonista G preparados pelo método de ligação direto ou de pós-inserção, a diversas concentrações lipídicas: 2000 μM (azul), 1000 μM (laranja), 750 μM (verde). As medianas foram calculadas em 10 000 eventos de uma só experiência de citometria de fluxo, pelo *software Attune® Cytometric Software v2.1, Applied Biosystems*.

Usando o valor das medianas da intensidade de fluorescência obtidas a partir dos histogramas foi possível notar diferenças entre a autofluorescência das células e a fluorescência devida à marcação dos lipossomas, o que indica que de facto deve estar a ocorrer a ligação aos recetores e uma possível internalização de lipossomas pelas células H69. Para além disso, observou-se um aumento da intensidade de fluorescência consoante se aumentou a concentração lipídica da formulação colocada a incubar com as células. Isto pode estar a ocorrer devido ao aumento da quantidade de lipossomas que se ligam às células e são internalizados, não estando a concentração lipídica adicionada no limite da capacidade de endocitose das células.

Relativamente ao possível efeito do direcionamento no aumento da ligação e possível internalização – que foi observado na microscopia de fluorescência –, este não parece existir nos valores obtidos na citometria de fluxo, uma vez que os lipossomas direcionados (RhodDirLipNeut e RhodPosInsLipNeut) possuem intensidades de fluorescência medianas inferiores à dos não direcionados (RhodNDLipNeut). Este fator pode dever-se à intensidade de fluorescência um pouco mais elevada observada nas formulações não direcionadas (Tabela IV.9), o que pode contribuir para uma maior marcação com rodamina B das células incubadas com esses lipossomas comparativamente às células incubadas com os lipossomas direcionados.

Os lipossomas que têm lípidos catiónicos foram igualmente analisados por citometria de fluxo da mesma forma que os lipossomas com lípidos neutros, tendo-se obtido resultados análogos, com o aumento da mediana da intensidade de fluorescência detetada pelo filtro BL2 no caso onde não há direcionamento. Neste caso a formulação não direcionada também possuía uma intensidade de fluorescência da rodamina B um pouco maior (Tabela IV.9).

Assim, apesar dos resultados qualitativos obtidos por microscopia de fluorescência terem demonstrado que a autofluorescência das células era desprezável e que possivelmente havia uma maior internalização dos sistemas lipossomais direcionados por uma ordem crescente consoante a presença de antagonista G ligado covalentemente aos lipossomas aumentava, isso não foi confirmado pela análise quantitativa. Desta forma, as conclusões que se podem retirar são que existe ligação aos recetores, com possível internalização, de lipossomas pelas células H69, pois observa-se o aumento da fluorescência comparativamente às células que não foram incubadas com lipossomas, e que estas aumentam – visto que aumenta o nível marcação das células com fluorescência da rodamina B – conforme a incubação é realizada com maior concentração lipossomas.

Ora, apesar de pela análise da mediana se perceber estes efeitos, eram expetáveis diferenças mais evidentes nos resultados da citometria de fluxo, nomeadamente que fossem perceptíveis pela análise visual dos gráficos de intensidade de fluorescência, devido às diferenças observadas na microscopia de fluorescência, o que não ocorreu. Isto pode dever-se a três fatores: ao facto de se ter utilizado um tempo de incubação das células com os lipossomas de 1 h, pois as diferenças qualitativas no efeito do direcionamento na internalização foram bastante mais significativas com um período de incubação de 3 h, ao facto do método de desagregação utilizado na citometria de fluxo ser mais agressivo para as células H69, podendo fazer com que os seus recetores superficiais percam afinidade para o antagonista G, e à insuficiente excitação da rodamina B devido ao facto do *laser* do citómetro de fluxo que foi utilizado para excitar as amostras, ter um comprimento de onda de 488 nm. Ora, como o rendimento quântico da rodamina B varia consoante o solvente em que se encontra – 0,32 em solventes aquosos e 0,7 em etanol¹⁰⁴ – e o fluoróforo pode sofrer *quenching* devido à presença, por exemplo, de outras moléculas de rodamina B nas proximidades¹⁰⁴, por si só a fluorescência que é detetada no citómetro devido à marcação dos lipossomas com rodamina B pode variar. Para além disso, o espectro de excitação da rodamina B tem um máximo em torno dos 560 nm, o que fica bastante distante do comprimento de onda do *laser* usado. Assim sendo, como a excitação não está a ser feita perto do máximo de excitação, o rendimento quântico da fluorescência é mais baixo, o que faz com que a emissão de fluorescência também diminua bastante.

No caso de se analisar exclusivamente lipossomas, foi visto noutro estudo¹⁰⁵ que era possível distinguir lipossomas com e sem marcação com rodamina B (1 % mol de Rhod numa concentração lipídica de 1 mM) recorrendo ao *laser* de 488 nm na citometria de fluxo. Não obstante, como se está na presença de células que por si só têm autofluorescência, mesmo essas condições podem não ser suficientes para que sejam detetadas diferenças na intensidade de fluorescência.

Posto isto, é perceptível que mesmo que a deteção da fluorescência esteja a ser feita entre comprimentos de onda que apanham o seu máximo de emissão – 580 nm – como ocorre ao usar-se o filtro BL2, como a excitação é feita a um comprimento de onda afastado do pico máximo de excitação, vai haver bastante menos emissão, havendo o risco de não ser detetada muita emissão de fluorescência, como parece ser o caso dos resultados obtidos neste estudo.

V. Conclusões

Estão constantemente a ser desenvolvidas novas abordagens para o tratamento de diferentes tipos de cancro, algumas delas bastante promissoras como é o caso dos sistemas de veiculação de fármacos. A maioria dessas abordagens tem um fator em comum: o direcionamento do tratamento para um tipo específico de células tumorais, evitando-se então os efeitos adversos das terapias convencionais nos tecidos saudáveis.

A utilização de sistemas de veiculação de fármacos é bastante promissora no desenvolvimento de terapias para diversas patologias, nomeadamente para o tratamento de cancro, devido à elevada capacidade de adaptação que possuem consoante o objetivo pretendido, sendo capazes de diminuir os problemas de toxicidade que alguns agentes utilizados na quimioterapia têm, ao protegê-los do contacto direto com a circulação sanguínea e com componentes como proteínas circulantes; de permitir uma libertação do composto que transportam só após a chegada ao local alvo, diminuindo bastante as doses a administrar e de controlar o tipo de libertação que ocorre, mantendo a concentração do composto dentro da sua janela terapêutica durante um maior período de tempo. No geral, pode-se então dizer que este tipo de abordagem suscita interesse devido à capacidade de aumentar a eficácia dos tratamentos administrados.

Estes sistemas de veiculação podem ter naturezas distintas, entre elas encontram-se os sistemas de base polimérica e/ou lipídica ou mesmo partículas sólidas, sendo que os lipossomas são um dos casos que tem sido mais investigado como forma de transportar agentes antitumorais, podendo possuir um elevado tempo de circulação – devido à ligação de polímeros à sua superfície – e seletividade para as células alvo. A seletividade é conferida pela ligação à superfície dos lipossomas de agentes de direcionamento, como anticorpos ou péptidos, que vão ser reconhecidos por recetores que se encontram sobre-expressos nas células alvo ou então que são especificamente expressos nessas células.

Neste estudo foi utilizado exatamente um sistema lipídico desses, cuja seletividade foi conferida pelo antagonista G, que é um hexapéptido reconhecido por diversos recetores de neuropeptídeos sobre-expressos nas células de carcinoma de pequenas células do pulmão, como é o caso da linha celular clássica H69. Desta forma o trabalho efetuado – que foi desenvolvido com a perspetiva futura de originar uma alternativa terapêutica para o tratamento deste tipo de cancro de pulmão extremamente agressivo e com capacidade de desenvolver resistência aos agentes citostáticos utilizados na quimioterapia – consistiu na preparação de lipossomas direcionados com antagonista G por dois métodos de ligação distintos, de modo a avaliar a eficiência de ligação obtida em cada um, e da comparação das características e dos efeitos a nível de internalização celular de formulações lipossomais com lípidos neutros e catiónicos direcionadas com o mesmo péptido.

Um sistema lipossomal onde o agente de direcionamento é ligado posteriormente à preparação dos lipossomas ou micelas (consoante seja pelo método de ligação direto ou de pós-inserção), como é o caso do estudado neste trabalho, tem como principal vantagem a diminuição em cerca de metade da quantidade de agente de direcionamento necessário, pois não há o risco deste ficar virado para o interior dos lipossomas, diminuindo consideravelmente os custos envolvidos caso o agente de direcionamento seja caro, possibilitando ainda a ligação de diferentes compostos à superfície com funções distintas, como agentes de direcionamento, agentes fusogénicos que melhoram a fusão entre as membranas e agentes de contraste que permitem a aplicação de técnicas de imagiologia como ressonância magnética, funcionando o sistema lipídico como uma ferramenta de teragnóstico – tem capacidade de diagnóstico, conferida pelo agente de contraste, e de tratamento, conferida pelo agente terapêutico transportado.

O foco deste trabalho consistiu exclusivamente no estudo da ligação do agente de direcionamento, uma vez que as formulações não transportavam nenhum agente terapêutico, tendo-se conseguido ligar covalentemente uma quantidade bastante razoável de antagonista G em todas as formulações, independentemente do método usado. Como já foi discutido previamente, o método de ligação direto permitiu a obtenção de uma maior

eficácia de ligação do péptido que o de pós-inserção e conseguiu-se ainda obter uma quantidade superior de péptido ligado covalentemente nos lipossomas com lípidos catiónicos que a obtida noutros estudos¹⁰⁰.

Relativamente à internalização de lipossomas em células H69, qualitativamente observou-se com microscopia de fluorescência que quanto maior a quantidade de agente de direcionamento, maior era a ligação aos recetores celulares e, possivelmente, a internalização das nanopartículas lipídicas, principalmente para períodos de incubação mais longos. Isto confirma não só que a ligação entre o péptido e os lipossomas é realmente covalente, pois se fosse um caso de adsorção inespecífica o antagonista G era ligado e internalizado mas os lipossomas não, como também que a estrutura tridimensional do péptido se mantém após a ligação covalente, uma vez que este continua a ser reconhecido pelos recetores, podendo desencadear a endocitose dos lipossomas.

A relação que aparenta existir na análise qualitativa entre o facto de haver direcionamento e a associação celular dos lipossomas, não se conseguiu observar quantitativamente, obtendo-se valores medianos de intensidade de fluorescência mais elevados para as formulações não direccionadas. É de referir que só foi realizada uma experiência de citometria de fluxo com as condições de desagregação das células otimizada por uma questão de falta de tempo, mas tal como foi previamente referido, há a necessidade de repetir os ensaios quantitativos, preferencialmente nas condições ideais de excitação da rodamina B, de modo a perceber se a discrepância com os resultados obtidos na microscopia de fluorescência é consequência de falta de sensibilidade da técnica nas condições usadas.

Caso a análise qualitativa feita neste estudo coincida com dados quantitativos obtidos no futuro, pode estar-se perante duas abordagens promissoras no tratamento do carcinoma de pequenas células do pulmão, nomeadamente sistemas lipossomais (com lípidos neutros ou catiónicos) com capacidade de transporte de compostos terapêuticos com características distintas, de forma seletiva para as células tumorais alvo.

VI. Perspetivas futuras

Como o trabalho realizado neste estudo consistiu na continuação de trabalhos prévios^{100, 101}, o seu foco principal foi a comparação quer das características, como dos resultados obtidos para a internalização em células H69, de formulações com propriedades distintas, nomeadamente o facto de possuírem lípidos neutros ou catiónicos.

Na parte da caracterização o único fator que pode ser otimizado de futuro diz respeito ao índice de polidispersão dos lipossomas com lípidos catiónicos, bastando aumentar o número de passagens pelo filtro com 100 nm de diâmetro de poro, de modo a que no final a população de lipossomas fique toda com valores de diâmetro hidrodinâmico mais próximo do valor médio o que leva a uma formulação com melhores características.

Já nos resultados obtidos para a ligação aos recetores e possível internalização, em termos de análise qualitativa dos resultados, neste estudo conseguiu-se otimizar os parâmetros a utilizar, nomeadamente a concentração de lipossomas a adicionar na incubação com as células H69 e o método de fixação das células em suspensão, não havendo nenhuma sugestão a apresentar. Pelo contrário, na análise quantitativa – fator muito importante pois indica a possibilidade de uma aplicação *in vivo* do sistema de veiculação de fármacos ser ou não eficaz –, de modo a que se conseguissem retirar conclusões mais significativas, podiam alterar-se diversos fatores, entre eles, utilizar-se um citómetro de fluxo que possuísse um *laser* mais próximo do comprimento de onda máximo da rodamina B, pois isso iria aumentar a fluorescência detetada pelo filtro, ou então aumentar a percentagem de rodamina B nos lipossomas, por exemplo para uma concentração lipídica de 1 mM com 1 % mol de Rhod, como foi utilizado noutro estudo¹⁰⁵.

Podia ainda optar-se por aumentar o tempo de incubação nas amostras usadas na citometria de fluxo, com base nos resultados da microscopia de fluorescência, onde se observou uma diferença maior no nível de fluorescência conferida pela rodamina B às células ao fim de 3 horas e, com base nos resultados obtidos por Moreira e colegas⁸², sugerindo-se a realização de vários tempos de incubação na citometria de fluxo para ver se há aumento da intensidade de fluorescência e, consequentemente, da internalização dos lipossomas nas células H69 e se é detetável alguma influência do direcionamento dos sistemas lipídicos na sua internalização.

Outro tipo de abordagem poderia consistir na alteração do fluoróforo usado, de modo a que o seu máximo de excitação fosse mais semelhante ao comprimento de onda do *laser* do citómetro, mantendo-se o seu máximo de emissão entre os comprimentos de onda que os filtros disponíveis detetam, pois assim iria haver um melhor rendimento quântico, aumentando a fluorescência detetada e, possivelmente, tornando mais evidentes as diferenças existentes na associação celular. Ao escolher um novo fluoróforo, um fator crucial que devia ser mantido é a sua localização nas membranas lipossomais, visto que para além do fluoróforo estar ligado à cabeça polar dos fosfolípidos – caso da Rhod usada neste estudo – há igualmente a possibilidade deste estar inserido nas cadeias que ficam no meio da bicamada lipídica, podendo diminuir o seu rendimento quântico.

Caso nenhuma destas opções fosse viável podia sempre recorrer-se a outras estratégias que permitem uma análise quantitativa da associação celular dos lipossomas como, por exemplo, substituir o fluoróforo por um marcador radioativo, que pode ficar incorporado ou encapsulado nas formulações lipossomais, usando-se técnicas de contagem de radioisótopos que são bastante mais sensíveis que a medição da intensidade de fluorescência (a qual pode ser igualmente afetada por diversos fatores como foi previamente explicado).

Como se observou que a ligação e possível internalização de lipossomas não direcionados ainda eram elevadas e que só ao fim de algum tempo é que o direcionamento aparentava conferir vantagens, podia investigar-se melhor o tráfego intracelular que ocorre nas células H69 usando inibidores de diferentes passos da via endocítica e que afetassem seletivamente diferentes tipos de endocitose.

Por fim, como as formulações que foram estudadas não continham nenhum composto que tivesse uma ação antitumoral relativamente ao SCLC, que é o objetivo final do desenvolvimento deste sistema lipídico de veiculação de fármacos direcionado com antagonista G, um possível trabalho a ser realizado no futuro pode consistir na encapsulação de diversos compostos nas formulações tirando partido das propriedades destas, ou seja, nos lipossomas com lípidos catiónicos utilizar diferentes tipos de material genético tal como foi feito por Carvalho¹⁰⁰, ver se a caracterização das formulações se mantém e prosseguir para estudos *in vivo* de forma a investigar se esta é efetivamente uma alternativa terapêutica para este tipo de cancro.

BIBLIOGRAFIA

1. Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90 (2011).
2. Jadus, M. R. *et al.* Lung cancer: a classic example of tumor escape and progression while providing opportunities for immunological intervention. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 160724 (2012).
3. Weinmann, M., Jeremic, B., Bamberg, M. & Bokemeyer, C. Treatment of lung cancer in elderly part II: small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **40**, 1–16 (2003).
4. Hann, C. L. & Rudin, C. M. Fast, hungry and unstable: finding the Achilles' heel of small-cell lung cancer. *Trends Mol. Med.* **13**, 150–157 (2007).
5. Sekine, I. *et al.* Treatment of small cell lung cancer in the elderly based on a critical literature review of clinical trials. *Cancer Treat. Rev.* **30**, 359–368 (2004).
6. Pietanza, M. C., Byers, L. A., Minna, J. D. & Rudin, C. M. Small cell lung cancer: will recent progress lead to improved outcomes? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 2244–2255 (2015).
7. Jackman, D. M. & Johnson, B. E. Small-cell lung cancer. *The Lancet* **366**, 1385–1396 (2005).
8. Fischer, B., Marinov, M. & Arcaro, A. Targeting receptor tyrosine kinase signalling in small cell lung cancer (SCLC): What have we learned so far? *Cancer Treat. Rev.* **33**, 391–406 (2007).
9. Murren, J., Glatstein, E. & Pass, H. I. Small Cell Lung Cancer. *Cancer Princ. Pract. Oncol.* **6**, 983–1018 (2001).
10. Wu, H.-C., Chang, D.-K. & Huang, C.-T. Target Therapy for Cancer. **2**, 57–66 (2006).
11. Vilar, G., Tulla-Puche, J. & Albericio, F. Polymers and Drug Delivery Systems. *Curr. Drug Deliv.* **9**, 367–394 (2012).
12. Couvreur, P. & Vauthier, C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharm. Res.* **23**, 1417–1450 (2006).
13. Blanco, E. *et al.* Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects. *Cancer Sci.* **102**, 1247–1252 (2011).
14. Müller, R. H., Jacobs, C. & Kayser, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 3–19 (2001).
15. Venditto, V. J. & Szoka Jr., F. C. Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs! *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 80–88 (2013).
16. Duncan, R. & Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the Microscope. *Mol. Pharm.* **8**, 2101–2141 (2011).
17. Allen, T. M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 750–763 (2002).
18. Rabkin, R. & Dahl, D. C. in *Biological Barriers to Protein Delivery* (eds. Audus, K. L. & Raub, T. J.) 299–338 (Springer US, 1993). doi:10.1007/978-1-4615-2898-2_12
19. Gombotz, W. R. & Pettit, D. K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjug. Chem.* **6**, 332–351 (1995).
20. Ulbrich, K. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1023–1050 (2004).
21. Bangham, A. D. Membrane models with phospholipids. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **18**, 29–95 (1968).
22. Bangham, A. D. Liposomes: the Babraham connection. *Chem. Phys. Lipids* **64**, 275–285 (1993).
23. Sessa, G. & Weissmann, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Res.* **9**, 310–318 (1968).
24. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238–252 (1965).
25. Bangham, A. D. Physical Structure and Behavior of Lipids and Lipid Enzymes. *Adv. Lipid Res.* **1**, 65–104 (1963).

26. Gregoriadis, G., Leathwood, P. D. & Ryman, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* **14**, 95–99 (1971).
27. Forssen, E. A. & Tökès, Z. A. Use of anionic liposomes for the reduction of chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 1873–1877 (1981).
28. Laouini, A. *et al.* Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **1**, 147–168 (2012).
29. Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z. & Ho, R. J. Y. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* **103**, 29–52 (2014).
30. Mayhew, E., Lazo, R., Vail, W. J., King, J. & Green, A. M. Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *Biochim. Biophys. Acta* **775**, 169–174 (1984).
31. Tejera-Garcia, R., Ranjan, S., Zamotin, V., Sood, R. & Kinnunen, P. K. J. Making unilamellar liposomes using focused ultrasound. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **27**, 10088–10097 (2011).
32. Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, 467–508 (1980).
33. Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 4194–4198 (1978).
34. Batzri, S. & Korn, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **298**, 1015–1019 (1973).
35. Gentine, P., Bourel-Bonnet, L. & Frisch, B. Modified and derived ethanol injection toward liposomes: development of the process. *J. Liposome Res.* **23**, 11–19 (2013).
36. Kremer, J. M., Esker, M. W., Pathmamanoharan, C. & Wiersema, P. H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry (Mosc.)* **16**, 3932–3935 (1977).
37. Wagner, A. & Vorauer-Uhl, K. Liposome Technology for Industrial Purposes. *J. Drug Deliv.* **2011**, e591325 (2010).
38. Meure, L. A., Foster, N. R. & Dehghani, F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *AAPS PharmSciTech* **9**, 798–809 (2008).
39. Torchilin, V. & Weissig, V. *Liposomes: A Practical Approach*. (OUP Oxford, 2003).
40. Milsmann, M. H., Schwendener, R. A. & Weder, H. G. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. *Biochim. Biophys. Acta* **512**, 147–155 (1978).
41. Frederiksen, L., Anton, K., van Hoogevest, P., Keller, H. R. & Leuenberger, H. Preparation of liposomes encapsulating water-soluble compounds using supercritical carbon dioxide. *J. Pharm. Sci.* **86**, 921–928 (1997).
42. Nelson, D. L., Lehninger, A. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2008).
43. Vemuri, S. & Rhodes, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv.* **70**, 95–111 (1995).
44. Malvern. *Zetasizer Nano Series User Manual*. (Malvern Instruments Ltd., 2013).
45. Shaw, R. *Dynamic Light Scattering Training*. (Malvern Instruments Ltd., 2014).
46. Sze, A., Erickson, D., Ren, L. & Li, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *J. Colloid Interface Sci.* **261**, 402–410 (2003).
47. Hunter, R. J. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. (Academic Press, 2013).
48. Storm, G. & Crommelin, D. J. A. Liposomes: quo vadis? *Pharm. Sci. Technol. Today* **1**, 19–31 (1998).
49. Sharma, A. & Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int. J. Pharm.* **154**, 123–140 (1997).
50. Thassu, D., Deleers, M. & Pathak, Y. V. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. (CRC Press, 2007).

51. Juliano, R. L. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2**, 31–54 (1988).
52. Becker, S. Functions of the human mononuclear phagocyte system (a condensed review). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2**, 1–29 (1988).
53. Kao, Y. J. & Juliano, R. L. Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. Effects of reticuloendothelial blockade on the clearance of large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **677**, 453–461 (1981).
54. Gaspar, M. M. *et al.* Developments on drug delivery systems for the treatment of mycobacterial infections. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 579–591 (2008).
55. Storm, G., Belliot, S. O., Daemen, T. & Lasic, D. D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **17**, 31–48 (1995).
56. Allen, T. M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **13**, 285–309 (1994).
57. Parr, M. J., Ansell, S. M., Choi, L. S. & Cullis, P. R. Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1195**, 21–30 (1994).
58. Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* **53**, 283–318 (2001).
59. Webb, M. S. *et al.* Comparison of different hydrophobic anchors conjugated to poly(ethylene glycol): effects on the pharmacokinetics of liposomal vincristine. *Biochim. Biophys. Acta* **1372**, 272–282 (1998).
60. Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7413–7417 (1987).
61. Zuhorn, I. S., Engberts, J. B. F. N. & Hoekstra, D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur. Biophys. J. EBJ* **36**, 349–362 (2007).
62. Stuart, D. D. & Allen, T. M. A new liposomal formulation for antisense oligodeoxynucleotides with small size, high incorporation efficiency and good stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1463**, 219–229 (2000).
63. Lenssen, K., Jantscheff, P., von Kiedrowski, G. & Massing, U. Combinatorial synthesis of new cationic lipids and high-throughput screening of their transfection properties. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **3**, 852–858 (2002).
64. Li, Y. *et al.* Relationships between liposome properties, cell membrane binding, intracellular processing, and intracellular bioavailability. *AAPS J.* **13**, 585–597 (2011).
65. LaVan, D. A., McGuire, T. & Langer, R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1184–1191 (2003).
66. Juliano, R. L. & Stamp, D. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 651–658 (1975).
67. Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F. C. & Wagner, E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1437–1446 (1996).
68. Godbey, W. T. in *An Introduction to Biotechnology* 275–312 (Woodhead Publishing, 2014).
69. Takano, S., Aramaki, Y. & Tsuchiya, S. Physicochemical Properties of Liposomes Affecting Apoptosis Induced by Cationic Liposomes in Macrophages. *Pharm. Res.* **20**, 962–968
70. Epstein-Barash, H. *et al.* Physicochemical parameters affecting liposomal bisphosphonates bioactivity for restenosis therapy: internalization, cell inhibition, activation of cytokines and complement, and mechanism of cell death. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **146**, 182–195 (2010).
71. Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**, 189–207 (2001).
72. Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Dvorak, J. T. & Dvorak, A. M. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am. J. Pathol.* **133**, 95–109 (1988).

73. Bitounis, D., Fanciullino, R., Iliadis, A. & Ciccolini, J. Optimizing Druggability Through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharm.* **2012**, (2012).
74. Accardo, A. & Morelli, G. Peptide-targeted liposomes for selective drug delivery: Advantages and problematic issues. *Biopolymers* **104**, 462–479 (2015).
75. Rozengurt, E. Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **13**, 128–134 (2002).
76. Sethi, T., Langdon, S., Smyth, J. & Rozengurt, E. Growth of Small Cell Lung Cancer Cells: Stimulation by Multiple Neuropeptides and Inhibition by Broad Spectrum Antagonists in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* **52**, 2737s–2742s (1992).
77. MacKinnon, A. C. *et al.* [Arg6, D-Trp7,9, NmePhe8]-substance P (6–11) (antagonist G) induces AP-1 transcription and sensitizes cells to chemotherapy. *Br. J. Cancer* **83**, 941–948 (2000).
78. Sinnett-Smith, J., Santiskulvong, C., Duque, J. & Rozengurt, E. [d-Arg1,d-Trp5,7,9,Leu11]Substance P Inhibits Bombesin-induced Mitogenic Signal Transduction Mediated by Both Gq and G12 in Swiss 3T3 Cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 30644–30652 (2000).
79. Heasley, L. E. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene* **20**, 1563–1569 (2001).
80. Woll, P. J. & Rozengurt, E. A neuropeptide antagonist that inhibits the growth of small cell lung cancer in vitro. *Cancer Res.* **50**, 3968–3973 (1990).
81. MacKinnon, A. C. *et al.* [Arg6,D-Trp7,9,NmePhe8]-substance P (6-11) activates JNK and induces apoptosis in small cell lung cancer cells via an oxidant-dependent mechanism. *Br. J. Cancer* **80**, 1026–1034 (1999).
82. Moreira, J. N., Hansen, C. B., Gaspar, R. & Allen, T. M. A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically stabilized liposomes in human small cell lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1514**, 303–317 (2001).
83. Moreira, J. N., Ishida, T., Gaspar, R. & Allen, T. M. Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity. *Pharm. Res.* **19**, 265–269 (2002).
84. Moreira, J. N. & Gaspar, R. Antagonist G-mediated targeting and cytotoxicity of liposomal doxorubicin in NCI-H82 variant small cell lung cancer. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica Al* **37**, 1185–1192 (2004).
85. Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T. & Bilgicer, B. A systematic analysis of peptide linker length and liposomal polyethylene glycol coating on cellular uptake of peptide-targeted liposomes. *ACS Nano* **7**, 2935–2947 (2013).
86. Shahin, M. *et al.* Engineered breast tumor targeting peptide ligand modified liposomal doxorubicin and the effect of peptide density on anticancer activity. *Biomaterials* **34**, 4089–4097 (2013).
87. Feldborg, L. N., Jølk, R. I. & Andresen, T. L. Quantitative Evaluation of Bioorthogonal Chemistries for Surface Functionalization of Nanoparticles. *Bioconj. Chem.* **23**, 2444 (2012).
88. Liu, J., Detrembleur, C., Mornet, S., Jérôme, C. & Duguet, E. Design of hybrid nanovehicles for remotely triggered drug release: an overview. *J. Mater. Chem. B* **3**, 6117–6147 (2015).
89. Kirpotin, D. *et al.* Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry (Mosc.)* **36**, 66–75 (1997).
90. Menezes, D. E. L. de, Kirchmeier, M. J., Gagne, J.-F., Pilarski, L. M. & Allen, T. M. Cellular Trafficking and Cytotoxicity of Anti-Cd19-Targeted Liposomal Doxorubicin in B Lymphoma Cells. *J. Liposome Res.* **9**, 199–228 (1999).
91. Ishida, T., Iden, D. L. & Allen, T. M. A combinatorial approach to producing sterically stabilized (Stealth) immunoliposomal drugs. *FEBS Lett.* **460**, 129–133 (1999).

92. Semple, S. C. *et al.* Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1510**, 152–166 (2001).
93. Rouser, G., Fkeischer, S. & Yamamoto, A. Two dimensional then layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494–496 (1970).
94. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*. (Academic Press, 2013).
95. Casey, K. G. & Quitevis, E. L. Effect of solvent polarity on nonradiative processes in xanthene dyes: Rhodamine B in normal alcohols. *J. Phys. Chem.* **92**, 6590–6594 (1988).
96. Eltoun, I., Fredenburgh, J., Myers, R. B. & Grizzle, W. E. Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *J. Histotechnol.* **24**, 173–190 (2001).
97. Corvo, M. L. *et al.* Superoxide dismutase enzymosomes: carrier capacity optimization, in vivo behaviour and therapeutic activity. *Pharm. Res.* **32**, 91–102 (2014).
98. Li, J. *et al.* A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, 81–98 (2015).
99. Moreira, J. N. Vectorização de lipossomas para o cancro humano de pequenas células de pulmão. (2001).
100. Carvalheiro, M. C. Liposomes as nanosystems for the transport and delivery of bioactive agents - Doutoramento em Farmácia. (Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 2010).
101. Holovanchuk, D. Otimização do direcionamento para células tumorais de nanosistemas lipídicos para uso terapêutico - Mestrado em Bioquímica. (Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2014).
102. Shapiro, H. M. *Practical Flow Cytometry*. (John Wiley & Sons, 2005).
103. Lopez-sanchez, N. & Frade, J. M. Cell Cycle Analysis in the Vertebrate Brain Using Immunolabeled Fresh Cell Nuclei. (2013). Available at: <http://www.bio-protocol.org/e973>. (Accessed: 29th August 2016)
104. Arbeloa, F. L., Ojeda, P. R. & Arbeloa, I. L. Fluorescence self-quenching of the molecular forms of Rhodamine B in aqueous and ethanolic solutions. *J. Lumin.* **44**, 105–112 (1989).
105. Temmerman, K. & Nickel, W. A novel flow cytometric assay to quantify interactions between proteins and membrane lipids. *J. Lipid Res.* **50**, 1245–1254 (2009).

Anexos/Appendices

Appendix 1

**Poster Presentation for “8th iMed.ULisboa Postgraduate
Students Meeting & 1st i3DU Meeting”**

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa,

14/07/2016

Active targeting of lung tumor cells with antagonist G-labeled long circulating liposomes

Silva A^{*a,c}, Carvalheiro M^b, Holovanchuk D^{a,c}, Camelo C^c, Peneda C^c, Soares, H^{c,d}, Marinho HS^c Corvo ML^a

^a *InTraCell_ADD*, ^b *Nano2B, Research Institute of Medicines (iMed.Ulisboa), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal*, ^c *CQB - Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal*; ^d *Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, IPL, Lisboa, Portugal*

* **Email:** fc41848@alunos.fc.ul.pt

One of the most promising approaches for anticancer therapy is the design of drug delivery systems specifically targeted to tumor cells. Among them, the construction of liposomes sterically stabilized with PEG (LCL) together with the addition of targeting molecules for selective cellular delivery of these particles is particularly promising. Previous work has shown that many small cell lung cancer (SCLC) cell lines, such as the H69, express receptors for the neuropeptide antagonist G. The aim of this work was to study the ability of antagonist G as a ligand at the surface of LCL to selectively improve their internalization in the H69 cell line. For that purpose, antagonist G-targeted LCL were prepared by two distinct methods: a direct method - antagonist G was covalently linked to pre-formed liposomes, and a post-insertion method - antagonist G was covalently linked to pre-formed DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide micelles and then inserted into the liposomes. All liposomes were characterized for their size, zeta potential and antagonist G/lipid ratio. The conjugation of antagonist G did not affect the size or the zeta potential of liposomes. However, both methods enable the development of antagonist G-targeted liposomes for *in vitro* assays. To study the *in vitro* internalization in H69 cell line, targeted and non-targeted liposomes were labeled with PE-Rhodamine B and the fluorescent intensity was observed by fluorescence microscopy and quantified by flow cytometry. The results showed that the targeted liposomes prepared by both methods were more internalized by H69 cells than non-targeted liposomes. This enhanced internalization promoted by antagonist G indicates the potential use of antagonist G-targeted LCL as a selective vehicle for drug delivery in the treatment of SCLC.

Acknowledgements: We thank the FCT for financial support. This work was supported by UID/DTP/04138/2013 and UID/MULTI/00612/2013

INTRODUCTION

- Small cell lung cancer (SCLC): a type of lung cancer characterized by early metastatization and development of resistance to chemo and radiotherapy
- The classical SCLC cell line, H69 cell line, expresses multiple neuropeptides' receptors that are inhibited by antagonist G (Sethi *et al.*, 1992)
- A promising approach for anticancer therapy: drug delivery systems, such as long circulating/sterically stabilized liposomes, targeted specifically to tumor cells
- Preparation of liposomes can be done by distinct methods: direct coupling or post-insertion method

Aim of this work: to study the ability of antagonist G to selectivity improve the internalization of long circulating/sterically stabilized liposomes in H69 cell line

METHODS

Neutral liposomes were prepared as described in Holovanchuk, 2014 and cationic liposomes were prepared as described in Carneiro, 2010 according to the formulations in Table 1 and sized by extrusion up to 0.1 µm. Antagonist G was covalently linked to liposomes by two distinct methods, as depicted in figure 1. Liposomes were incubated for 1 and 3 h with H69 cells and their internalization was observed using fluorescence microscopy. The aperture used in the camera was 3.2, the exposure time was 1/5 s for rhodamine's filter and 1/200 s for DAPI's filter.

RESULTS

Table 1 – Composition of the liposomal formulations prepared by the direct coupling method (DIR) or post-insertion method (PI and PICAT).

Formulation	Molar ratio
EPC:Chol:PEG:Rhod (NT)	68.25:30.5:1.25:0.1
EPC:Chol:PEG:PEG-Mal:Rhod (DIR)	68.25:30.5:0.55:0.7:0.1
EPC:Chol:PEG:PEG-Mal:Rhod (PI)	68.25:30.5:0.55:0.7:0.1
DSPC:Chol:DODAP:PEG:Rhod (NTCAT)	20:45:25:8:0.25
DSPC:Chol:DODAP:PEG:PEG-Mal:Rhod (PICAT)	20:45:25:8:2:0.25

EPC- L-α-phosphatidylcholine; Chol- cholesterol; PEG- 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000]; PEG-Mal - 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000]; DSPC- 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DODAP- 1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane; Rhod - L-α-Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)

Table 2 - Hydrodynamic diameter (D_h), polydispersity index (PDI), zeta potential at pH 6.0 (ζ) and antagonist G to total lipid ratio before and after the linkage of antagonist G to liposomes.

Liposomes	D _h (µm)	PDI	ζ (mV)	Peptide/lipid (% mol)
NT	0.12	0.087	-1.3	-
DIR	0.11	0.077	-1.8	0.37
PI	0.12	0.072	-2.9	0.16
NTCAT	0.09	0.112	-1.8	-
PICAT	0.10	0.120	-1.4	0.94

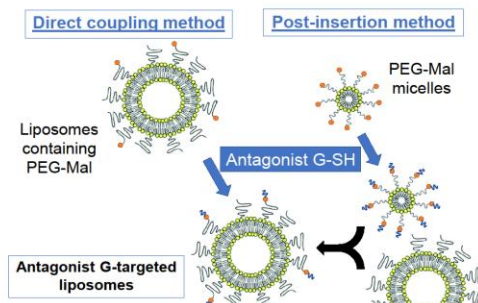


Figure 1 – Schematic representation of the two methods used to prepare antagonist G-targeted liposomes. PEG-Mal: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide (polyethylene glycol)-2000].

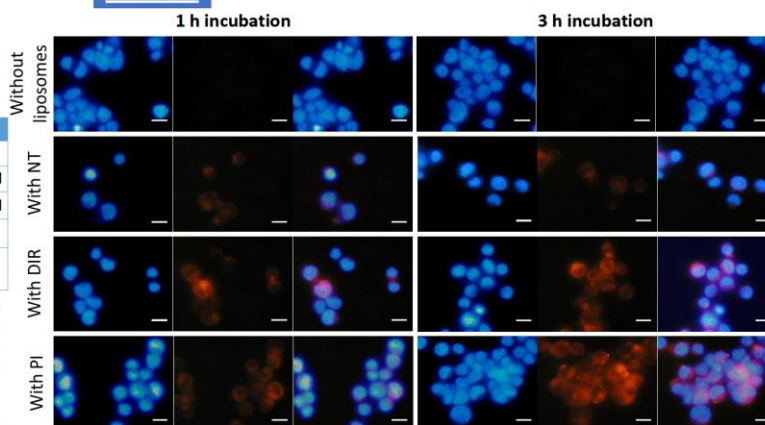


Figure 2 - Fluorescence microscopy images of H69 cells after 1 h or 3 h of incubation in the presence of 250 µM of liposomes with or without covalently linked antagonist G obtain with Olympus BX41 fluorescent microscope (PlanApo objective, 60x magnification). Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde and DNA was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Scale bar – 10 µm.

Fluorescence microscopy of cationic liposomes showed similar results to those obtained using neutral liposomes: NTCAT were similar to NT and PICAT to PI.

CONCLUSIONS

- Antagonist G-targeted long circulating/sterically stabilized liposomes showed a higher internalization in H69 cells than non-targeted liposomes, independently of being neutral or cationic liposomes.
- The enhanced internalization of liposomes promoted by antagonist G in SCLC cells suggests that antagonist G-targeted liposomes are a promising selective vehicle for drugs in the treatment of this aggressive disease.

REFERENCES:

- Sethi T., Langdon S., Smyth J., Rozengurt E. Cancer Res., 1992, 52 (9Supplement), 2737s
- Carneiro M. C. Liposomes as Nanosystems for the Transport and Delivery of Bioactive Agents Doutoramento em Farmácia (Tecnologia Farmacêutica), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2010
- Holovanchuk D. Otimização do direccionamento para células tumorais de nanosistemas lipídicos para uso terapêutico Mestrado em Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2014

ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank the FCT for financial support. This work was supported by UID/DTP/04138/2013 and UID/MULTI/00612/2013